

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. Koolman
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

„Identifizierung klinisch relevante Epitope der E.coli-
Asparaginase mit Hilfe synthetischer Peptide“

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

Anne Sabrina Werner

aus

Bonn

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am 28.05.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Klaus-Heinrich Röhm

1. Koreferent: Prof. Dr. Reinier Mutters

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Überblick.....	S.07
1.2 Akute lymphatische Leukämie (ALL).....	S.08
1.2.1 Epidemiologie.....	S.08
1.2.2 Ursachen und Entstehung.....	S.09
1.2.3 Symptome.....	S.09
1.2.4 Diagnostik und Klassifikation.....	S.10
1.2.5 Risikofaktoren.....	S.11
1.2.6 Therapie.....	S.11
1.2.7 Prognose.....	S.12
1.3 Asparaginase.....	S.12
1.3.1 Wirkungsmechanismus von Asparaginase.....	S.12
1.3.2 Struktur der Asparaginase.....	S.14
1.3.3 Einsatz in der Therapie der ALL.....	S.15
1.3.4 Toxizität und Immunogenität.....	S.17
1.3.5 Pharmakodynamik.....	S.20
1.3.6 Pharmakokinetik.....	S.20
1.3.7 Klinischer Hintergrund.....	S.21
1.3.8 Assay-Entwicklung	S.22
1.4 Epitope	S.24
1.5 Epitopen-Mapping.....	S.25
1.6 Phage Display	S.25
1.7 Die SPOTs Kit Methode.....	S.26
1.8 Prinzipien der Peptidsynthese.....	S.27
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	S.28

2. Material und Methoden

2.1 Material.....	S.29
2.1.1 Geräte.....	S.29
2.1.2 Chemikalien.....	S.29
2.1.3 Lösungen.....	S.30
2.1.4 Enzyme.....	S.32
2.1.5 SPOTs-Membran (Sigma genosys, The Woodlands, USA).....	S.32
2.1.6 Antiserum.....	S.32
2.1.7 Aktive Fmoc-Aminosäure-Ester.....	S.32
2.1.8 Probanden-Seren.....	S.32
2.1.9 Computerprogramme.....	S.32
2.2 Methoden.....	S.33
2.2.1 Bestimmung der Peptidwahl.....	S.33
2.2.2 Entfernung freier Amine aus DMF- und NMP-Lösung.....	S.33
2.2.3 Vorbereitungen für die Bromphenol-Blau-Testlösung.....	S.35
2.2.4 Herstellung der 1%igen Bromphenol-Blau-Testlösung.....	S.35
2.2.5 Bromphenol-Blau-Test für DMF- und NMP-Lösung.....	S.35
2.2.6 Herstellung der 20%igen Piperidin/DMF-Lösung.....	S.35
2.2.7 Präparation der aktiven Fmoc-Aminosäure-Ester.....	S.36
2.2.8 Vorbereitungen vor der Peptidsynthese.....	S.37
2.2.9 Peptid-Synthese.....	S.37
2.2.10 Acetylierung.....	S.41
2.2.11 Entfernung des Seitenkettenschutzes.....	S.41
2.2.12 Inkubation mit Antikörpern.....	S.42
2.2.13 Kolorimetrische-Detektion.....	S.43
2.2.14 Chemilumineszenz-Detektion.....	S.44
2.2.15 Regeneration der Membran.....	S.44

3. Ergebnisse

3.1 Roh-Scan der Membranen	S.45
3.2 Scan der Membranen mit Anti-EcA2-IgG (Kaninchen).....	S.45
3.2.1 Membran I.....	S.45
3.2.2 Membran II.....	S.46
3.3 Scan mit humanen Seren.....	S.47
3.4 Serum des Probanden A.W.....	S.47
3.4.1 Membran I.....	S.47
3.4.2 Membran II.....	S.48
3.5 Serum des Probanden H.-J.M.....	S.48
3.5.1 Membran I.....	S.48
3.5.2 Membran II.....	S.49
3.6 Tabellarische Gegenüberstellung der Ergebnisse.....	S.50

4 Diskussion

4.1 SPOTs Methodik.....	S.52
4.1.1 Qualität und Reproduzierbarkeit.....	S.52
4.1.2 Korrelation zwischen Signalintensität und Affinität.....	S.53
4.1.3 Auswertung.....	S.54
4.1.4 Eigenschaften der gefundenen Epitope.....	S.55
4.1.5 Vergleich mit Erwinia-Asparaginase.....	S.58
4.1.6 Lage der dominanten EcA2-Epitope in der Tertiärstruktur.....	S.59
4.2 Reaktivität von Probandenserum.....	S.60
4.3 Klinische Relevanz.....	S.61
4.4 Ausblick.....	S.62

5 Zusammenfassung	S.64
-------------------------	------

6 Abkürzungsverzeichnis	S.65
-------------------------------	------

7 Literaturverzeichnis	S.68
------------------------------	------

8	Abbildungsverzeichnis	S.76
9	Tabellenverzeichnis	S.77
10	Anhang	
10.1	Übersicht SPOTs Sequenzen.....	S.78
10.2	Buchstabencode der Aminosäuren.....	S.80
11	Akademische Lehrer.....	S.81

1. Einleitung

1.1 Überblick

In der Therapie von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie spielt das Enzym Asparaginase (Asnase) eine große therapeutische Rolle. Die Ansprechraten auf Asnase-Gabe variieren von 25% bis zu über 60% bei Patienten im Relaps nach vorheriger Chemotherapie. Über 95% der Kinder erreichen initiale Remission, wenn die Induktions-Chemotherapie Asnase enthält (Ortega et al., 1977)^[74]. Da das Enzym nicht direkt hämatologische Toxizität zeigt, kann es in kombinierten Mehrfachschemata von Chemotherapien selbst zu Zeitpunkten angewendet werden, bei denen aufgrund der Krankheit selbst (Induktion) oder als Folge anderer angewendeter Chemotherapeutika (Konsolidierung, Intensivierung, Reinduktion) eine Knochenmarkdepression erwartet werden muss.

Asnase spaltet die Aminosäure L-Asparagin, die für das Wachstum bestimmter Tumorzellen essentiell, für die meisten Körperzellen jedoch eine nicht-essentielle Aminosäure ist. Durch die Depletion des L-Asparagin-Serumpools wird somit den maligne transformierten Zellen die Erhaltungsgrundlage entzogen, während alle anderen Zellen Asparagin über eine Synthetase bei Bedarf eigenständig herstellen können. Die derzeit therapeutisch eingesetzten Formen der L-Asparaginase werden aus *Escherichia coli* bzw. *Erwinia chrysanthemi* gewonnen. In Deutschland sind zwei Präparate auf dem Markt: Asparaginase Medac[®] und Oncaspar[®]. Beide Enzyme besitzen in vivo eine relativ kurze Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 0.6 bis 1.2 Tagen. Um diese recht kurze Zeit zu verlängern und damit die Anzahl der benötigten Applikationen zu reduzieren, wird an die native Asnase monomethoxyliertes Polyethylenglykol (PEG) kovalent gebunden, was die mittlere Halbwertszeit auf etwa 6 Tage verlängert (Schwartz et al., 1970)^[90]. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass die Dauer der Asparagin-Depletion im Serum direkt in Verbindung mit der Halbwertszeit steht.

Die Gabe von Asnase ist mit einer Reihe von unerwünschten Wirkungen assoziiert, vor allem mit Hepatotoxizität und daraus resultierend Hypoglykämie, Hypolipoproteinämie, Hypoalbuminämie und Gerinnungsfaktormangel, sowie mit Pankreatitis (Kodama et al., 1974; Asselin et al., 1993; Nowak-Gottl,

1996)^{[42], [5], [68]}. Da Asnase ein bakterielles Protein ist, sind auch Hypersensitivitätsreaktionen möglich. Zusätzlich kann es zur klinisch stummen Asnase-Inaktivierung, der so genannten „silent inactivation“ kommen, die vermutlich durch Bildung von Antikörpern des Typs IgG gegen das Asnase-Molekül entstehen (Killander et al., 1976)^[41]. Das Problem hierbei liegt in der Tatsache, dass die reduzierte Halbwertszeit $t_{1/2}$ zu einer verkürzten Asparagin-Depletion und damit reduzierter Effektivität führt, während sich vom klinischen Eindruck her nicht auf die Inaktivierung schließen lässt. Hierbei sprechen Patienten mit hohen Titern an Anti-Asnase-Antikörpern mit geringerer Wahrscheinlichkeit auf ein Fortführen der Therapie an als solche mit niedrigeren Titern.

1.2 Akute Lymphatische Leukämie (ALL)

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) ist eine maligne, rasch-progredient verlaufende Erkrankung lymphatischer Zellen. Die eigentliche Ursache der Erkrankung ist noch nicht bekannt. Risikofaktoren für eine Erkrankung sind hingegen vielfältig (unter anderem genetische Ursachen, physikalische Einflüsse, Virusinfektionen). Durch die maligne transformierten Zellen wird die normale Hämatopoese im Knochenmark verdrängt. Dementsprechend sind die auftretenden Symptome zunächst solche der Knochenmarksinsuffizienz, wie z.B. Blässe, Abgeschlagenheit, Blutungsneigung oder Infektzeichen. Aber auch eine Hepatosplenomegalie und Knochen- sowie Gelenkschmerzen treten häufig auf. Die Diagnostik umfasst neben der klinischen Untersuchung vor allem die Bestimmung verschiedener Laborparameter (Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin) einschließlich zytomorphologischer und immunphänotypologischer Klassifikation und damit Risikostratifizierung. Therapie der Wahl ist eine Polychemotherapie sowie die Behandlung begleitender Symptome und Komplikationen.

1.2.1 Epidemiologie

Bezogen auf alle Altersgruppen hat die ALL eine relativ niedrige Inzidenz von etwa 1,5 Neuerkrankungen pro 100.000 pro Jahr. Dabei überwiegt etwas das männliche Geschlecht mit einem Verhältnis von 1,4:1. Für Deutschland werden bei Erwachsenen und bei Kindern etwa 500 Neuerkrankungen pro Jahr

angenommen. Das Lebenszeitrisko, an einer ALL zu erkranken, beträgt etwa 1:838, d. h. statistisch gesehen wird eine Person unter 838 in ihrem Leben an ALL erkranken. Die Altersverteilung der Erkrankung zeigt zwei Gipfel: einen hohen bei Kindern um 4 Jahre (Prävalenz: 6.5 pro 100.000) und einen zweiten, etwas geringeren bei über 80-jährigen (Prävalenz: 1.5 pro 100.000).

Im Vergleich der beiden akuten Leukämieformen macht die ALL beim Erwachsenen anteilig lediglich etwa 15% aus, während die restlichen 85% AML-Formen sind. Bei Kindern hingegen ist das Verhältnis genau umgekehrt, was die ALL damit zu der häufigsten malignen Erkrankung des Kindesalters macht (Hersch, 1973, Henze, 1993, Deutsches Kinderkrebsregister)^{[33], [32], [21]}.

1.2.2 Ursachen und Entstehung

Ursächlich sind es meist erworbene genetische Veränderungen einer lymphatischen Vorläuferzelle, die zur malignen Transformation führen. Obwohl Risikofaktoren für die Entstehung identifiziert wurden (ionisierende Strahlung, bestimmte Chemikalien), lässt sich in den meisten Fällen kein direkter Auslöser finden. Ausgenommen hiervon ist die in Europa so gut wie nicht vorkommende adulte T-Zell-Leukämie, die durch das HTLV-1-Virus ausgelöst wird.

Die maligne transformierte Zelle und die durch Zellteilung aus ihr entstandenen Tochterzellen vermehren sich dann unkontrolliert und verdrängen die normale Hämatopoese im Knochenmark.

1.2.3 Symptome

Im Vordergrund der Symptomatik steht die Störung der normalen Hämatopoese mit den Folgen einer Anämie, Thrombozytopenie und relativer Leukopenie an funktionsfähigen Leukozyten, die wiederum mit Schwäche, Blutungsneigungen und Infektanfälligkeit einhergehen. Etwa 68% der Patienten haben eine Hepatosplenomegalie, 61% haben Fieber (Temperatur > 38.5°C) und rund die Hälfte zeigt eine Lymphadenopathie (Margolin et al., 2003)^[53]. Problematisch ist hierbei vor allem die Tatsache, dass die Symptome in der Regel erst relativ spät im Verlauf der Krankheit auftreten und die Diagnosestellung somit oft in bereits fortgeschrittenem Stadium erfolgt.

1.2.4. Diagnostik und Klassifikation

Um die Diagnose einer ALL stellen zu können, wird ein Knochenmarkausstrich benötigt, weil so auch Formen erkannt werden können, bei denen noch keine leukämische Ausschwemmung ins periphere Gefäßsystem stattgefunden hat – so genannte aleukämische Form – bzw. die genaue Zuordnung in Hinblick auf Zytogenetik, Reifegrad etc. erfolgen kann. Je nachdem ob Leukämiezellen bei noch normaler oder schon erhöhter Gesamtleukozytenzahl im Blut nachweisbar sind, spricht man von einem subleukämischen oder leukämischen Verlauf.

Ausschlaggebende Faktoren für die Diagnosestellung einer ALL sind:

- Nachweis eines Anteils von mindestens 20-25% lymphatischer Blasten im Knochenmark
- Zuordnung der Blasten zur lymphatischen Reihe durch Immunphänotypisierung
- Nachweis charakteristischer genetischer Veränderungen (MLL-Gen (11q23-Aberration), BCR-ABL t(9;22), E2A-PBX1 t(1;19), u.a.)

Klassifiziert wird, wie in Tabelle 1.1 aufgeführt, nach der FAB-Klassifikation mit drei unterschiedlichen Morphologien (L1, L2, L3) (Margolin et al., 2003)^[53].

Zytomorphologische FAB-Klasse	Charakteristika
FAB L1	Kleine Zellen vorwiegend mit einheitlicher Größe, gleichförmiges Chromatin, Zellkern nicht sichtbar oder klein, regelmäßig vorfindbare Nucleoli, sehr wenig Zytoplasma, leichte bis mäßige Basophilie, unterschiedliches Ausmaß von Vakuolen im Zytoplasma
FAB L2	Große Zellen mit unterschiedlicher Größe, ungleichförmiges Chromatin, Zellkern mit unregelmäßigen Spalten und Kerben, einer oder mehrere oftmals große Nucleoli, variable Größe des Zytoplasmas, mäßige bis oft starke Basophilie, unterschiedliches Maß an Vakuolen im Zytoplasma
FAB L3	Große Zellen mit einheitlicher Größe, gleichförmig fein gesprenkeltes Chromatin, ovaler bis runder Zellkern, hervorstechende Nucleoli (auch mehrere), viel Zytoplasma, sehr starke Basophilie, oft hervorstechende Vakuolen im Zytoplasma

Tabelle 1.1 Zytomorphologische Befunde nach FAB-Klassifikation bei Kindern mit ALL

Zusätzlich wird anhand der Immunphänotypisierung spezifiziert, indem über Identifizierung von Protein-Expressionsmustern im Zytoplasma oder an der

Zelloberfläche gemäß den Antigenen eine Zuordnung zur B- oder T-Zell-Reihe sowie das Differenzierungsstadium festgelegt werden.

Die Einordnung erfolgt hierbei dem Reifungsgrad folgend nach der EGIL-Klassifikation (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias) (Bene et al., 1995)^[7].

Bei Erwachsenen beträgt das Verhältnis von Leukämien der B-Zell-Reihe zu solchen der T-Zell-Reihe etwa 75% zu 25%, bei Kindern sogar 85% zu 15%.

1.2.5 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren werden hier Umstände bezeichnet, die dem Patienten ein höheres Risiko für ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie oder für ein Rezidiv zusprechen, als dies bei Patienten ohne diese Faktoren der Fall ist. Trotz uneinheitlicher Studiengruppen und Therapieschemata ergaben sich folgende prognostisch ungünstige Risikofaktoren:

- Philadelphia-Chromosom (BCR-ABL-Fusionsgen) (Ribera et al., 2002)^[83] oder MLL-Fusionsgen
- verzögertes Ansprechen auf die Therapie (insbesondere nach der Induktionsphase)
- hohe Tumorlast (tumor burden) in Form von hoher peripherer Leukozytenzahl
- ZNS-Befall (Clarke et al., 2003 ; te Loo et al., 2006)^{[17], [51]}
- Patientenalter: je jünger, desto bessere Heilungschancen, wobei Säuglinge ausgenommen sind (Möricke et al., 2005)^[61]
- Minimal residual disease (Anteil an Leukämiezellen nach der Therapie).

Gelingt es nicht, diesen Wert unter 10^{-4} zu drücken, ist ein Rezidiv praktisch sicher (Nyvold et al., 2002; Marshall et al., 2003; Brüggemann et al., 2006; Raff et al., 2007)^{[70], [54], [9], [76]}

1.2.6 Therapie

Die Behandlung erstreckt sich zumeist über 12 bis 24 Monate und besteht vereinfacht aus folgendem Ablauf-Schema:

Induktion → Konsolidierung → Re-Induktion → Erhaltung

Zusätzliche Maßnahmen zur regulären Chemotherapie umfassen je nach Krankheitsverlauf und Krankheitsbefund Mediastinal- oder ZNS-Bestrahlungen, die intrathekale Gabe von Methotrexat sowie Knochenmarktransplantationen.

Tabelle 1.2 zeigt hierbei einen Überblick über die am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika.

I	Induktionstherapie mit anschließender Induktionskonsolidierung	Prednison, Vincristin (VCR), Daunorubicin (DNR), Asparaginase (L-ASP), Methotrexat (MTX), Cyclophosphamid (CPM), Cytarabin (ARA-C), 6-Mercaptopurin (MP)
II	Extrakompartimenttherapie	MP, MTX
III	Reinduktionstherapie	Dexamethason (DEXA), L-ASP, Doxorubicin (DOX), VCR, ARA-C, CPM, Thioguanin (TG)
IV	Erhaltungstherapie	MP (oder TG), MTX

Tab 1.2 Chemotherapeutika in den unterschiedlichen Behandlungsphasen der ALL

Zur Erfolgskontrolle werden wiederholt Knochenmark- und Liquorpunktionen sowie regelmäßige sonographische Erhebungen von Abdomen und auffälligen Lymphknoten durchgeführt.

1.2.7 Prognose

Bevor die heutzutage eingesetzten Chemotherapeutika zur Verfügung standen, bedeutete die Diagnosestellung ein sicheres Todesurteil. Je nach Stadium geschah dies zumeist innerhalb von Tagen bis Wochen mit vor allem Infektionen und Blutungen als Haupttodesursachen. Noch bis Anfang der 80er Jahre lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei erwachsenen ALL-Patienten in Deutschland unter 15%. Dank der Arbeit zahlreicher Therapiestudien und ihrer Empfehlungen liegt das Gesamtüberleben bei Kindern nun bei etwa 80%, bei Erwachsenen um die 40-45% (Tumorregister München)^[65].

1.3 Asparaginase

1.3.1 Wirkmechanismus von Asparaginase

Bereits in den frühen 50-er Jahren beobachteten Kidd et al., dass bestimmte Lymphome bei Mäusen und Ratten durch Meerschweinchen-Serum zerstört wurden (Kidd et al., 1953)^[40]. Kidd verwendete hierbei das Serum lediglich als Quelle für Komplementfaktoren, um die Antigen-Antikörper-Reaktion zu verstärken. Erst später gelang es Broome nachzuweisen, dass nicht etwa die im Serum enthaltenen Komplementfaktoren, sondern Asnase die wirksame Komponente im Serum war (Broome et al., 1961)^[8]. Etwa zur gleichen Zeit

wurde unter experimentellen Bedingungen nachgewiesen, dass bestimmte Neoplasien die Aminosäure Asparagin zum Wachstum essentiell benötigen, da bei ihnen ein spezifischer Defekt der Asparagin-Synthetase vorliegt (Oettgen et al., 1969)^[71]. Durch die Depletion von Asparagin wird den malignen Zellen eine für ihre Proteinsynthese essentielle Aminosäure entzogen, was wiederum zu reduzierter RNA- und DNA-Synthese und damit auf lange Sicht zum Zelltod führt. Dies scheint selektiv auf die Tumorzellen beschränkt zu sein, da Asparagin für normale Zellen nicht essentiell ist und eine Reduzierung des Asparagin-Pools bei jenen Zellen somit keinerlei Auswirkungen auf die Proteinsynthese hat. Durch diesen Unterschied im Stoffwechsel von normalen und malignen Zellen scheint Asparaginase eine Selektivität in der Wirkung zu besitzen.

Nahezu alle normalen Körperzellen können bei Bedarf Asparagin durch das Enzym Asparagin-Synthetase eigenständig synthetisieren:

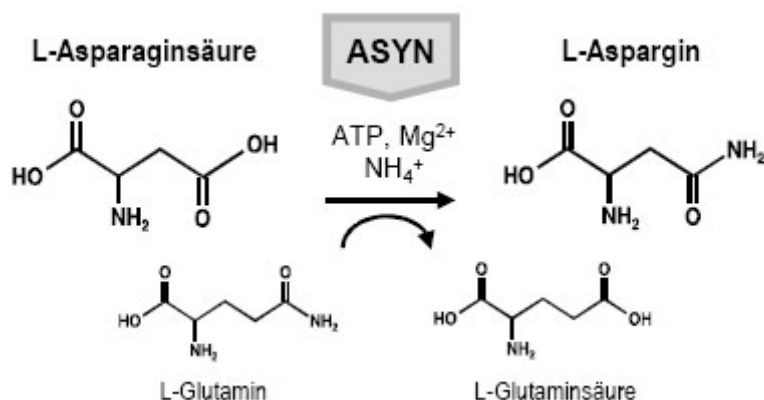
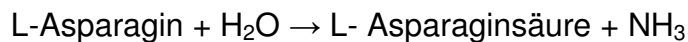


Abb 1.1 Katalytische Aktivität der Asparagin-Synthetase (ASYN)

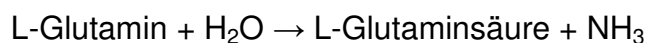
Über einen Feedbackmechanismus wird normalerweise die Aktivität dieses Enzyms auf kaum messbare Werte herunterreguliert. Kommt es durch Gaben von Asnase zu einer Depletion von Asparagin in Blut und Liquor, sorgt derselbe Feedbackmechanismus für eine Hochregulierung der Asparagin-Synthetase-Aktivität im normalen Gewebe. Schon 1969 konnten Haskell et al. zeigen, dass das Vorhandensein von Asparagin-Synthetase von zentraler Bedeutung für das Ansprechen von Tumorzellen auf Therapie mit L-Asparaginase ist (Haskell et al., 1969)^[31].

Nachdem verschiedene Mikroorganismen auf die Fähigkeit zur Asnase-Produktion getestet worden waren, zeigten Mashburn und Wriston 1964, dass die aus *E. coli* gewonnene Asnase in Bezug auf die Tumor-Wachstumshemmung in vitro noch effektiver war als Meerschweinchenserum (Mashburn et al., 1964)^[55]. Campell und Mashburn fanden heraus, dass *E. coli* zwei Asnase-Isoenzyme produziert, EC-1 und EC-2, wovon aber nur letzteres gegen Tumoren wirksam ist (Campell et al., 1969)^[11]. In den darauf folgenden Jahren wurde nach weiteren Bakterienspezies gesucht, die klinisch wirksame Asnase produzieren könnten. Hierbei fand sich bei *Erwinia crysanthemii* (früher auch *Erwinia carotovora* genannt) eine ebenfalls hohe Asnase-Aktivität, so dass auch dieses Bakterium zur therapeutischen Enzymgewinnung eingesetzt wird (Buck et al., 1971)^[10]. Daneben bilden noch weitere Spezies isolierbare klinisch wirksame Asparaginasen, z. B. *Serratia marcescens* und *Wolinella succinogenes*. Ende der 1960-er Jahre stand *E. coli*-Asnase EC-2 (im Folgenden mit EcA2 abgekürzt) in gereinigter Form in Mengen zur Verfügung, die auch die Durchführung klinischer Studien ermöglichten.

Asnase ist ein hydrolytisches Enzym (EC 3.5.1.1), das die Umwandlung der Aminosäure L-Asparagin in L-Asparaginsäure und Ammoniak katalysiert:



Darüber hinaus hydrolysieren die meisten bakteriellen Asnasen auch Glutamin nach folgendem Schema:



Nach Gabe von hohen Asnase-Dosen wurde auch eine Reduktion des zirkulierenden Glutamins nachgewiesen. Es wird vermutet, dass einige toxische Nebenwirkungen der Asnase, besonders jene auf das zentrale Nervensystem, über diesen Mechanismus und die damit verbundenen erhöhten Spiegel an Glutamat und Ammoniak bzw. durch den Mangel an Glutamin zustande kommen. Asnase aus Meerschweinchen besitzt diese Glutaminase-Aktivität zwar nicht, im Gegensatz zu den bakteriellen Asnasen ist jedoch die Produktion von ausreichenden Mengen des Meerschweinchenenzym technisch nicht machbar.

1.3.2 Struktur der Asparaginase

Asparaginase ist Bestandteil einer Vielzahl von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen. Die aus *E. coli* isolierte native EcA2 ist ein Tetramer mit der molekularen Masse von 138 kDa. Die vier identischen Untereinheiten sind über nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft und besitzen jeweils ein aktives Zentrum.

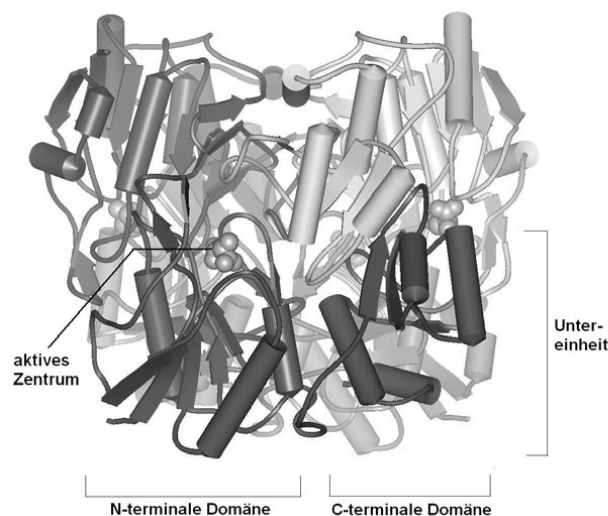


Abb 1.2 Struktur der *E.coli*-Asparaginase

Das aus *Erwinia* gewonnene Enzym (Abkürzung: ErA) hat eine sehr ähnliche Struktur und Masse wie EcA2, aber einen etwas anderen isoelektrischen Punkt. Immunologisch zeigen beide Enzyme nur eine eingeschränkte Kreuzreaktivität. Im Vergleich weist die ErA jedoch eine geringere Aktivität auf, so dass als klinische Konsequenz höhere Dosen und deutlich kürzere Applikationsintervalle vonnöten sind.

EcA2 hat eine niedrige Michaelis-Menten-Konstante für L-Asparagin ($6 - 15 \mu\text{M}$) und zeigt eine relativ hohe Substratspezifität. Selbst hohe Konzentrationen von Asparaginsäure oder Ammoniak inhibieren die Aktivität des Enzyms kaum.

1.3.3. Einsatz in der Therapie der ALL

Nachdem um 1960 die grundsätzliche Wirksamkeit gereinigter Asnase-Präparate nachgewiesen worden war, erfolgte zunächst der Vergleich von drei Präparaten (zwei aus *E. coli* und eines aus *Erwinia* gewonnen) hinsichtlich Darreichungsform (intravenös versus intramuskulär) und Reaktion. Hierbei ließ

sich keine Kreuzreaktion zwischen den beiden unterschiedlichen Bakterien feststellen, da bei zwei Patienten ein Umsteigen vom *E.coli*-Präparat auf das der Erwiniasie aufgrund von Hypersensitivitätsreaktionen erforderlich war und die Behandlung komplikationslos fortgesetzt werden konnte. Jedoch waren zu dem damaligen Zeitpunkt die Patientenstichproben noch sehr klein (Dellinger et al., 1976)^[20].

Nachdem Asnase im Laufe der Zeit in größeren Mengen zur Verfügung stand, konnten ausführliche Studien zu Wirksamkeit, Dosierung und Einsatz des Enzyms durchgeführt werden. Eine Studie der Cancer and Leukaemia Group B (CALGB) zeigte den besten Therapiererfolg bei einer Dosierung von 1000IU/(kg.d) Asparaginase gefolgt von einem dreiwöchigem Intervall mit der Verabreichung von Vincristin und Kortikosteroiden.

Zusätzlich lieferten Untersuchungen von Ertel et al.^[22] und Nesbit et al.^[67] im Rahmen der Children's Cancer Study Group (CCSG; später Children's Cancer Group, CCG) im Wesentlichen drei Erkenntnisse:

- 1) Asnase als alleiniges Therapeutikum führt in 30-50% der Fälle zu einer Remission. Zudem ist es für Reinduktionsschemata wirksam einsetzbar.
- 2) Die scheinbar effektivste Dosis, um bei Kindern eine Remission zu erzielen, beträgt $\geq 6000\text{IU}/\text{m}^2$ dreimal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen.
- 3) Obwohl für diesen Teilaspekt kein streng vorgegebenes Schema für Dosis, Zeitpunkt und Applikationsform vorgegeben war, erschien es so, als ob die intramuskuläre Gabe von Asparaginase (in ca. 4ml 0.9%iger Kochsalzlösung) bei gleicher Wirksamkeit weniger toxisch war.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich bei der Hinzunahme von Asnase in der Erhaltungstherapie die mittlere Remissionsdauer um ein Drittel verbesserte (Jones et al., 1977)^[38] und zu einem besseren Outcome auch bei Hoch-Risiko-ALL sowie nur schlechtem Ansprechen auf die Initialtherapie führte (Nachmann et al., 1998)^[66].

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist Asnase seit Beginn der 1980-iger Jahre ein fester Bestandteil der Therapie von akuter lymphatischer Leukämie und einiger Non-Hodgkin-Lymphome bei pädiatrischen und erwachsenen Patienten

(Gallagher et al., 1989)^[27]. Zur Induktion wird zumeist neben Asnase auch Prednison und Vincristin verabreicht.

In zahlreichen Untersuchungen konnte hingegen keine überzeugende Wirkung der Asnase in der Therapie von AML gezeigt werden. In einer Studie mit 34 erwachsenen Patienten kam es nur zu drei kompletten und einer Teilremission, deren Dauer jedoch unter einem Vierteljahr lag (Clarkson et al., 1975)^[18]. In weiteren Untersuchungen, die auch Kinder mit einschlossen, zeigte sich bei den pädiatrischen Patienten kein Ansprechen auf die Asnase-Gabe (Ohnuma et al., 1969/1970)^{[72], [73]} bzw. in einem von drei Fällen eine Teilremission (Pratt et al., 1970)^[75]. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass zumindest Patienten mit manchen AML-Formen von Asnase profitieren könnten, da in monoblastischen FAB M5 Zellen niedrige Asparaginsynthetase-Aktivität nachgewiesen wurde (Zwaan et al., 2000)^[100].

1.3.4 Toxizität und Immunogenität

Wie von Capizzi et al. im Einzelnen dargestellt, ist die Toxizität der Asnase zum einen auf die Wirkung des Enzyms selber (inhibierte Proteinsynthese, Glutaminase-Aktivität), zum anderen auf seine Immunogenität als großes Fremdprotein zurückzuführen (Capizzi et al., 1971)^[12].

a) Inhibition der Proteinsynthese:

Hierzu zählen Hyperglykämien aufgrund von Hypoinsulinämien, Hypolipoproteinämien und -albuminämien mit den üblichen klinischen Folgen wie z.B. Aszites. Aufgrund von Inbalancen innerhalb des empfindlichen Systems Gerinnung/Fibrinolyse kann es unter Asnase-Therapie sowohl zu Blutungen als auch zu Gerinnselbildung kommen. Wiewohl schwerste Vorfälle wie intracranielle Hämorrhagien oder Thrombosen nur bei einer kleinen Anzahl von Patienten beobachtet werden (1-2%), können diese fatal sein.

Daneben sind vor allem auch proteinreiche Organe von der Inhibition betroffen: bei ungefähr 1-2% der Patienten kommt es zu einer akuten Pankreatitis, die von milden Symptomen wie Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen bis hin zu potentiell tödlichen, hämorrhagischen Verlaufsformen reichen kann.

Eine hepatische Dysfunktion, sichtbar an erhöhten Leberwerten wie AST, ALT, AP und Bilirubin, ist vermutlich neben der mangelnden Proteinsynthese auch auf eine fettige Infiltration und Umwandlung des Lebergewebes zurückzuführen.

b) Glutaminase-Aktivität:

Neurologische Symptome wie Somnolenz, Lethargie oder Verwirrheitszustände, die in der Therapie Erwachsener häufiger zu beobachten sind als in der von Kindern, sind vermutlich auf die Veränderungen im Aminosäure-Stoffwechsel und vor allem auf das vermehrte Anfallen von Glutamat und Ammoniak zurückzuführen.

c) Hypersensitivitätsreaktionen:

Immunologische Reaktionen spielen nach wie vor im klinischen Alltag eine bedeutende Rolle und stellen oft den Grund für Therapie-Limitierungen (Abbruch der Asparaginasegabe) dar.

Im Vergleich ist die native EcA die Asnase-Form mit der höchsten immunogenen Potenz, wobei die Reaktionen von leichten lokalen Ereignissen wie Rötung, Ödem und Ausschlag über schwere systemische Reaktionen in Form von Fieber oder Bronchospasmus bis hin zum manifesten anaphylaktischen Schock reichen können.

Das Auftreten solcher Reaktionen wird unterschiedlich hoch beschrieben und reicht je nach Studie, Dauer der Gabe und vorangegangenen Applikationen von 3% bis 70%.

Alternativ stehen das *Erwinia*-Präparat oder die pegylierte *E.coli*-Form zur Verfügung – in beiden Fällen konnte nachgewiesen werden, dass es nur zu wenigen Kreuzreaktionen zwischen den unterschiedlichen Formen kommt.

Bezüglich der Hypersensitivitätsreaktionen zeigte sich kein Unterschied zwischen *E.coli*- oder *Erwinia*-Asnase; in Bezug auf andere Komplikationen zeigte sich eine signifikant höhere Rate bei Verwendung des *E.coli*-Präparats für Neurotoxizität (4%), Pankreatitis (2%) und lebensbedrohliche Sepsis (20%) im Vergleich zum *Erwinia*-Enzym (2%, 0% und 18%).

Die Immunogenität von nicht körpereigenen Proteinen nimmt i. A. mit der taxonomischen Entfernung des Ursprungsorganismus sowie mit der Masse und strukturellen Komplexität zu. Bei Überempfindlichkeitsreaktionen kann aufgrund geringer Kreuzimmunogenität die Therapie mithilfe eines Präparatwechsels zumeist trotzdem weitergeführt werden, da es bei einem Wechsel von nativer EcA zu PEG-Asnase z.B. nur bei 20-25% der Patienten zu einer erneuten allergischen Reaktion kommt (Müller et al., 1998)^[62].

Es ist heute unbestritten, dass die Asnase-Verabreichung zur Bildung spezifischer Antikörper führt. Die darauf beruhenden unerwünschten Wirkungen reichen von harmlosen Lokalreaktionen an der Injektionsstelle über Bronchospasmus bis hin zu schwerem anaphylaktischen Schock. Von großem Interesse ist aber auch das Phänomen der „silent inactivation“, bei dem es zu einer raschen Inaktivierung des Enzyms mit einem Aktivitätsabfall unter die Quantifizierungsgrenze im Serum kommt, ohne dass sich klinisch eine Überempfindlichkeit bemerken ließe (Asselin et al., 1993)^[5]. Als Ursache dafür stehen zwei Theorien in der Diskussion: Zum einen werden inaktivierende Antikörper angenommen, zum anderen wird auch der enzymatische Abbau der Asnase diskutiert. Des Weiteren scheint es auch Patienten zu geben, bei denen zwar Antikörper im Serum nachweisbar sind, die aber dennoch keine klinische Reaktion oder Inaktivierung zeigen.

Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der Überempfindlichkeitsreaktion um eine allergische Reaktion vom Soforttyp (Typ I nach Coombs und Gell) handelt. Dies wird durch den Befund gestützt, dass viele Patienten dieses Kollektivs erhöhte IgG-Titer zeigten, wobei unterschiedliche Subklassen die jeweils stärkste Fraktion ausmachten. Dabei schienen Patienten mit Subtyp IgG-3 ein besonders hohes Risiko für das Auftreten allergischer Reaktionen zu haben; wohingegen Subtyp IgG-2 in keinem der Fälle gefunden wurde (Cheung et al., 1986; Korholz et al., 1987)^{[13], [43]}. Je nach Studie wird die Häufigkeit des Auftretens allergischer Reaktionen mit 5-33% angegeben, wobei die Wahrscheinlichkeit deutlich zunimmt, je häufiger Asnase innerhalb eines Therapiezyklus appliziert wird oder wenn eine erneute Asnase-Administration nach längerem Asnase-freiem Therapieintervall vorgenommen wird (Mathe et al., 1970; Dellinger et al., 1976)^{[56], [20]}.

1.3.5 Pharmakodynamik

Die normale Konzentration von Asparagin im Serum liegt bei 40-80 $\mu\text{mol/l}$. Durch die Hydrolyse von Asparagin zu Asparaginsäure und Ammoniak kommt es, wie erwähnt, zu einer raschen Depletion des Asparagin-Serumpools. Der Mangel an Asparagin führt über die gestörte Protein- und die nachfolgend inhibierte RNA-/DNA-Synthese zu raschem Zelltod, wobei Mechanismen wie Apoptose nicht ausgeschlossen werden können.

Nach wie vor ist nicht klar, wie die Asnase eliminiert wird. Vermutlich findet die Eliminierung vorrangig über das retikuloendotheliale System statt (Broome et al., 1968; Hall et al., 1970)^{[8], [30]}. Immunologische Reaktionen treten vor allem nach einem Therapieintervall ohne Asnase und erneuter Asnase-Exposition auf (Müller et al., 2000)^[64]. Hierbei stellt sich die Frage, ob das Immunsystem innerhalb dieses Asnase-freien Intervalls weiterhin mit Enzymprotein konfrontiert ist. Nach wie vor gibt es kaum Daten zur Korrelation zwischen der in Patientenseren gemessenen Enzymaktivität und der Serumkonzentration des Asnase-Proteins (Asselin et al., 1993; Schwartz et al., 1970)^{[5], [90]}.

Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe mit der Entwicklung eines Immunoassays zur quantitativen Bestimmung der Asnase im Serum begonnen (bisher unveröffentlichte Daten).

1.3.6 Pharmakokinetik

Einen wesentlichen Einfluss auf die Pharmakokinetik der Asnase übt die Induktion neutralisierender Antikörper aus, die zu einer klinisch „stummen“ Inaktivierung des Enzyms führen. Der Nachweis dieser „silent inactivation“ kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen kann nach Anti-Asnase-IgGs gesucht werden. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass bei hohen Antikörpertitern gegen Asnase die Ansprechrate auf Chemotherapie (sowohl für CR als auch PR) signifikant vermindert ist im Vergleich zu niedrigen Titern (26% gegenüber 64%; $p = 0.02$) (Kurtzberg et al., 1993)^[49].

Zum anderen kommt eine regelmäßige Kontrolle der Asnase-Aktivität und damit ihrer $t_{1/2}$ im Serum in Frage (drug monitoring). Eine verminderte Halbwertszeit der Asparaginase findet sich in 65-85% der behandelten Patienten und taucht zumeist schon weit vor einer klinisch merkbaren Hypersensitivität auf. Durch die

Pegylierung ergibt sich eine deutliche Verlängerung der Halbwertszeit von 0.65d (bei Erwinase) bzw. 1.27 d (bei nativer *E.coli*-Asnase) auf 5.7 d. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass PEG die Halbwertszeit von Enzymen oder Medikamenten generell verlängert. Bei hohen Antikörper-Titern wird die Halbwertszeit für PEG-Asnase auf 2.59 d herabgesetzt (Asselin et al., 1993)^[5].

1.3.7 Klinischer Hintergrund

Aufgrund der oben bereits beschriebenen, in ihrer Anzahl zunehmenden hämorrhagischen und thrombotischen Zwischenfälle, wurde an der Universitätsklinik Münster ein Drug-Monitoring-Programm für Kinder nach Asnase-Gabe im Rahmen der Induktionstherapie für ALL und NHL entwickelt. Zur Induktion wurden Asparaginase medac® und Crasnitin™ in einer Dosierung von 10.000U/m² Körperoberfläche alle drei Tage eingesetzt. Dabei ergaben sich bemerkenswerte Unterschiede bezüglich der gemessenen Talaktivitäten der Aktivitäten kurz vor erneuter Medikationsgabe. Falls es im Rahmen der Therapie zu allergischen Reaktionen gekommen war, wurde auf das entsprechende *Erwinia chrysanthemi* Präparat (Erwinase™) umgestellt (Müller et al., 1998, von Randow, 2005)^{[63], [77]}.

Als am effektivsten, in Hinblick auf den Endpunkt Asnase-Depletion, zeigte sich das medac® Präparat mit einer Verringerung des Substratpools im Plasma von über 90%, gefolgt von Crasnitin™ (60%) und Erwinase™ (26%). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass trotz beachtlicher interindividueller Variation eine Dosis von 2500 U/m² KÖF jeden dritten Tag gegeben ausreichend ist, um eine zufriedenstellende Asparagindepletion in Serum und Liquor zu erreichen (Riccardi et al., 1981; Nowack-Gottl et al., 1997; Ahlke et al., 1997)^{[84], [69], [1]}. Aufgrund der Variationsbreite wurde für Deutschland von der Arbeitsgruppe in Münster ein spezielles Drug-Monitoring-Programm entwickelt.

Ziel der Induktionstherapie ist es, eine Asparagin-Depletion über einen Zeitraum von 14-21 Tagen bei Kindern und 14 Tagen bei Erwachsenen zu erreichen. Durch die Verwendung von PEG-Asnase wurde dieses Ziel bereits nach einer einmaligen Gabe von 1000 U/m² erreicht (Müller et al., 2000)^[64]. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der ersten Verabreichung wurde die Asnase-Aktivität gemessen, um Hinweise zur Dosisfindung und auf mögliche Antikörper-Bildung zu erhalten.

1.3.8 Assay-Entwicklung

Mehrere Arbeitsgruppen haben versucht, einen Assay zum Nachweis von Antikörpern gegen das komplette Asnase-Molekül in Patientenseren zu entwickeln (Wang et al., 2000; Albertsen et al., 2002)^{[95], [3]}, wobei der von Wang et al. beschriebene Test am praktikabelsten erscheint. Schnell zeigte sich jedoch, dass sich auf Grundlage dieser Assays wegen ihrer geringen Selektivität keinerlei Vorhersagen für den Therapieverlauf bei einzelnen Patienten machen lassen.

Dies wird aus Abb.1 deutlich, die Daten von Woo et al. (1998)^[99] zeigt. Man erkennt, dass der zeitliche Verlauf von Antikörper-Titern gegen das komplette Asnase-Molekül bei Patienten mit („reacting“) und ohne („nonreacting“) allergische Reaktionen nicht wesentlich differiert. Innerhalb der Gruppe der „reacting“ Patienten gab es sogar einige, bei denen der Antikörper-Titer über den Vergleichszeitraum abfiel.

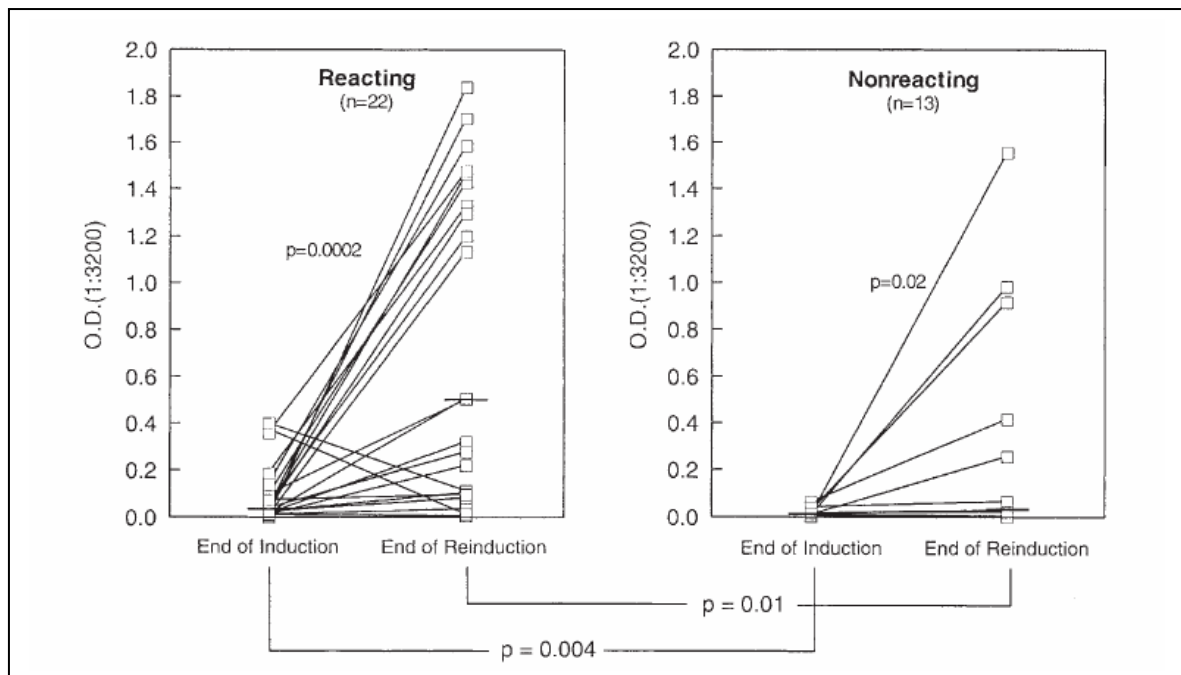


Abb. 1.3 Konzentrationen von Anti-Asnase-Antikörpern gemessen am Ende der Induktionsphase (nach Gabe von im Mittel neun Dosen Asnase ohne Auftreten klinischer Reaktionen) und am Ende der Reinduktionsphase (nach Gabe von im Mittel 25 Dosen Asnase und gleichzeitig mindestens einer allergischen Reaktion) in Patienten mit und ohne Hypersensitivitätsreaktionen.

Da ein selektiv gestalteter Assay für Anti-Asnase-Antikörper jedoch viele Vorteile für die individuelle und schonende Therapiegestaltung hätte, wurde 1998 in einer Kooperation von Arbeitsgruppen aus Münster und Marburg damit

begonnen, einen epitopenspezifischen Antikörper-Assay zum Drug-Monitoring von *E.coli*-Asnase zu entwickeln.

Als ersten Ansatz wurden hierfür Asparaginase-Moleküle mit Proteasen verdaut, um so kleinere Fragmente mit nur wenigen oder sogar nur einem möglicherweise klinisch relevanten Epitop zu erhalten. Die gewonnenen Fragmente wurden dann als Antigene in einem herkömmlichen ELISA eingesetzt. Aufgrund von nicht ausreichender antigener Aktivität der Fragmente musste der Ansatz jedoch wieder aufgegeben werden.

Im nächsten Schritt wurden von Stefan Schleper in unserer Arbeitsgruppe größere Asnase-Stücke als GST-Fusionsproteine exprimiert und als Antigene im ELISA-Test eingesetzt (Schleper S, 1999)^[88]. Die Auswahl der Fragmente erfolgte hierbei mehr zufällig, da noch keine EcA2-Epitope mit klinischer Relevanz bekannt waren.

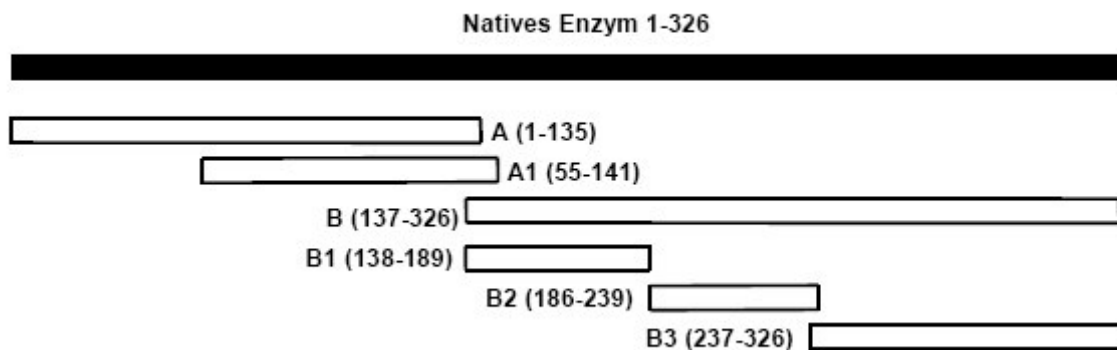


Abb 1.4 Asparaginase-Fragmente, die als Fusionsproteine mit GST zur Bestimmung von Antikörpertitern verwendet wurden. Die Zahlen beziehen sich auf die Lage in der Aminosäuresequenz.

Hierbei umfasste Teilstück A etwa 40% der Sequenz am N-terminalen Ende des Proteins und Fragment B die restlichen 60% der Subfragmente. In den durch Josefine von Randow weitergeführten Untersuchungen zeigte sich, dass in vielen Patientenseren hohe Titer vor allem gegen das relativ kleine C-terminale Fragment (89 Aminosäuren bzw. 27% der Gesamtstruktur) nachweisbar waren. Obwohl wegen einer zu geringen Zahl von Proben die statistische Signifikanz der Ergebnisse nicht ausreichend war, deutete sich an, dass ein Anstieg des Antikörper-Titers gegen das C-terminale Fragment (B und

vor allem B3) in Patientenseren häufig mit einem vorzeitigen Asnase-Aktivitätsabfall einhergeht (v. Randow, 2005)^[77].

Um die Spezifität des Assays weiter zu verbessern, war es im Folgenden wünschenswert, durch ein systematisches Epitop-Mapping die Grundlagen für die Konstruktion selektiverer Fragmente zu schaffen.

1.4 Epitope

Die meisten Antigene sind Proteine oder Proteide, also Proteine, die neben dem Eiweißanteil Kohlenhydrate oder andere Nicht-Eiweiß-Bestandteile enthalten. Ein einzelnes Antigen besitzt dabei verschiedene Epitope, die jeweils art- bzw. individualspezifisch sind. Epitope (Synonym: antigene Determinante) sind kleine Abschnitte innerhalb eines Antigens, gegen die das Immunsystem individuelle Antikörper bildet.

Bei Epitopen unterscheidet man zwischen kontinuierlichen und diskontinuierlichen. Diskontinuierliche oder konformative Epitope kommen dadurch zustande, dass die Aminosäure-Ketten in Proteinen dreidimensional gefaltet sind, und somit innerhalb der Aminosäure-Sequenz weit auseinanderliegende Aminosäure-Reste aufgrund der Faltung im Raum sehr nah beieinander liegen und somit interagieren können. Kontinuierliche Epitope werden von in der Sequenz aufeinander folgenden Aminosäuren gebildet. Sie lassen sich in der Regel auch nach Denaturierung des Protein-Antigens identifizieren. Bisherige Untersuchungen beschränken sich auf kontinuierliche Epitope.

Man unterscheidet weiterhin zwischen B- und T-Zell-Epitopen. Lösliche Antikörper und Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen besitzen einen variablen F_{ab} -Teil, der komplementär zu B-Zellepitopen ist (Paratop) und somit mit hoher Affinität an sie binden kann. B-Zell-Epitope werden meist von einer Teilsequenz aus 5-20 Aminosäuren gebildet. Für die Immunantwort relevant ist meist nur eine geringe Anzahl starker Epitope, was auch als „Immunodominanz“ bezeichnet wird (Alberts et al., 1995)^[2].

T-Zell-Epitope, die meist eine Aminosäure-Sequenz von 8-13 Aminosäuren umfassen, werden vom zugehörigen T-Zell-Rezeptor erst dann erkannt, wenn das Antigen prozessiert wurde und die resultierenden Peptide an ein MHC-

Protein gebunden präsentiert werden. Im Unterschied zu den B-Zell-Epitopen handelt es sich bei T-Zell-Epitopen also immer um lineare Epitope.

Um eine hohe Antigenität zu vermitteln, müssen B-Zell-Epitope in der Regel in relativ flexiblen Abschnitten der Peptidkette liegen, weshalb sie oft Bestandteil von Peptidschleifen („loops“) sind. Zudem enthalten sie oft geladene Reste wie Asp und Glu (sauer) oder Arg und Lys (basisch). Ein Epitop wird dann als relevant für die Bindung eines Antikörpers angesehen, wenn seine Aminosäure-Sequenz essentiell für diesen Bindungsprozess ist, d.h. wenn ein Austausch einer einzelnen Aminosäure zum Verlust der Antikörper-Bindungsfähigkeit führt.

1.5 Epitop-Mapping

Zur Identifizierung von Epitopen sind verschiedene Herangehensweisen möglich. Die größte Aussagekraft bei zugleich höchstem Arbeitsaufwand hat die Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen ein Epitop. Besonders geeignet ist dieser Weg bei linearen Epitopen. Weitere Ansätze sind das so genannte Phage Display und Verfahren der kombinatorischen Chemie, mit deren Hilfe sich überlappende Teilpeptide beliebiger Länge gegen mono- oder polyklonale Antiseren screenen lassen. Auf ein kombinatorisches Verfahren, die so genannte SPOTs-Technik, wird im Rahmen dieser Arbeit näher eingegangen.

1.6 Phage Display

In Vorarbeiten durch H.-J. Müller erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Phage Display Kits (Ph.D.-7, New England Biolabs, Beverly, USA) die Identifizierung einiger Epitope des *E. coli*-Asnase-Proteins durch Panning mit einem polyklonalen Anti-Asnase-Serum aus Kaninchen.

Dieses Kit basiert auf einer Phagenbibliothek, deren M13-Phagen zufällige, 7-merige Peptidsequenzen an ein Hüllprotein (pIII) gebunden haben. Für unsere Zwecke wurde der mitgelieferte *E.coli*-Fq-Stamm ER2738 verwendet. Der F-Faktor dieses Stammes enthält ein Transposon, das Tetracyclin-Resistenz verleiht und somit eine spätere Selektion durch Tetracyclin-haltige Medien erlaubt. Die Infizierung findet über eine Bindung des Hüllproteins pIII an den F-Pilus des Empfängerbakteriums statt. Zur Unterscheidung, ob es sich tatsächlich um Phagen aus der verwendeten Bibliothek handelt, besitzen diese

ein implementiertes lacZa-Gen, das sie sich auf Medien mit Xgal und Isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) blau färben lässt.

Insgesamt konnte so DNA von 59 einzelnen Kolonien verwendet werden, um die Einzelstrang-DNA der Phagen zu sequenzieren. Die selektierten Heptapeptid-pIII-Fusionen wurden dann zum Screening nach potentiell in Frage kommenden Epitopen gegen die Sequenz der *E.coli*-Asparaginase getestet (Werner et al, 2005)^[98].

1.7 Die SPOTs-Methode

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe eines Verfahrens der kombinatorischen Chemie (SPOTs-Technik) insgesamt 159 Peptide aus der Sequenz der *E. coli*-Asnase synthetisiert und als Antigene zum Screening nach Anti-Asnase-Antikörpern eingesetzt.

Die SPOTs Synthese, also die parallele chemische Synthese von Peptidbibliotheken auf einer Zellulosemembran, wurde ursprünglich entwickelt, um das Mapping von Proteinepitopen zu erleichtern (Frank et al., 1991/1992)^{[24], [25]}. Seitdem wurde der Anwendungsbereich dieser Technik ständig ausgeweitet (Molina et al., 1996)^[59]. So wurden u. A. so genannte „scanning libraries“ hergestellt (Kramer et al., 1994; Frank et al., 1996)^{[46], [26]} oder Bibliotheken, die aus Peptiden mit freien Carboxy-Enden bestehen (Hoffmüller et al., 1999)^[35]. Mit so hergestellten Bibliotheken wurden Peptide identifiziert, welche Proteine (Kramer et al., 1993/1994; Reineke et al., 1995/1998; Weiergräber et al., 1996)^{[45], [46], [79], [80], [96]}, Metalle (Schneider-Mergener et al., 1996; Malin et al., 1995)^{[87], [52]} oder Nukleinsäuren (Reuter et al., 1999)^[82] binden. Auch zur Bestimmung der Substratspezifität von Kinasen oder Proteasen (Tegge et al., 1995; Moilanen et al., 1998)^{[92], [58]} lassen sich SPOTs-Bibliotheken einsetzen. Die SPOTs-Methode ist zusätzlich in der Lage, unterschiedliche Konformationszustände von Proteinen anzuzeigen (Reineke et al., 1999)^[81] und kann auch mit D-Formen von Aminosäure sowie unnatürlicher Aminosäure durchgeführt werden (Kramer et al., 1998)^[47]. Weiterhin gelang es, Bibliotheken löslicher Peptide zu synthetisieren (Volkmer-Engert et al., 1997; Kramer et al., 1998)^{[94], [47]}, um damit Peptide zu identifizieren, die in der Interaktion von HIV-1 mit T-Zellen eine Rolle spielen (Heveker et al., 1998)^[34]. Die häufigste Anwendung ist jedoch nach wie vor das Mapping linearer Epitope

unter Verwendung überlappender Peptide, die aus der Primärstruktur eines gegebenen Proteins abgeleitet werden (Halimi et al., 1996; Schreiber et al., 1997; Riemekasten et al., 1998)^{[29], [89], [85]}.

1.8 Prinzipien der Peptidsynthese

Bei der chemischen Herstellung von Peptiden werden Aminosäuren durch Kondensationsreaktionen schrittweise miteinander verknüpft. Für einen eindeutigen Ablauf der Kondensationsreaktionen müssen die jeweils nicht zur Reaktion vorgesehenen Endgruppen (N-terminal bei der ersten Aminosäure, deren Carboxygruppe reagieren soll, und C-terminal bei der Aminosäure, deren Aminokomponente reagieren soll) und die reaktiven Seitenketten der trifunktionellen Aminosäure (Lys, Arg, His, Glu, Asp, Ser, Thr, Tyr, Cys) durch wieder abspaltbare Schutzgruppen blockiert werden.

Die 1963 von Merrifield erstmals beschriebene Festphasenpeptidsynthese auf polymerem Trägermaterial verläuft sequentiell vom C- zum N-Terminus. Die einzelnen Aminosäuren werden am Carboxyende aktiviert (z.B. als reaktive Ester) und dann an das freie Aminoende der Peptidkette geknüpft. Nach Abspaltung der Schutzgruppe folgt die Kupplung der nächsten N-terminal geschützten Aminosäure. Dieser Zyklus von Kupplung und Abspaltung wird so lange wiederholt, bis das Peptid die gewünschte Länge erreicht hat. Bei der Auswahl der Schutzgruppen ist zu beachten, dass während der Peptidsynthese immer wieder N-terminale Schutzgruppen abgespaltet werden müssen, ohne dass ein vorzeitiger Verlust der Seitenkettenprotektion eintreten darf. Dies wird über eine abgestufte Stabilität der Schutzgruppen erreicht (Merrifield et al., 1963)^[57].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fmoc-Strategie angewendet. Hierbei werden die α -Aminogruppen durch den basisch leicht abspaltbaren Fluorenylmethoxycarbonyl-Rest (Fmoc) gesichert, dessen Basenlabilität auf der Azidität des H-Atoms am C₉-Atom des Fluorensystems beruht. Die Fmoc-Schutzgruppe ist über eine Urethanbindung verbunden, die sich mit Piperidin unter β -Eliminierung wieder lösen lässt.

Für die Protektion der Seitenketten werden jedoch säurelabile Gruppen eingesetzt, so dass hierdurch eine differenzierte Herangehensweise möglich ist.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Auf der Basis der oben beschrieben gewonnenen ersten Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Verwendung des SPOTs-Kit auf der Proteinebene nach klinisch relevanten Epitopen der *E.coli*-Asnase gesucht, die im Zusammenhang mit dem immunologischen Phänomen der „silent inactivation“ von Bedeutung sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Glassäulen mit Ablasshahn	Aldrich, München
Haartrockner mit Kühlstufe	Braun, Kronberg
Löschpapier	Whatman Inc.Kent (GB)
Molekularsiebe	Sigma Genosys, The Woodlands,TX (US)
pH-Meter Toledo 340	Mettler, Gießen
Schüttelinkubator AK 82	Infors AG, Bottmingen (CH)
Stoppuhr	Braun, Kronberg
Tischzentrifuge Biofuge	Haereus, Osterode
Truhe mit Glasdeckel	Sigma Genosys, The Woodlands,Texas (US)
Waage BP 2100 S	Sartorius, Göttingen
Waage R 160 P	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank B 5050 E	Heraeus, Hanau
Zentrifuge J2-MC	Beckmann, München
Minifuge RF	Heraeus, Hanau
<h4>2.1.2 Chemikalien</h4>	
Bromphenolblau, Na-Salz	Roth, Karlsruhe
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
DMF	Sigma Aldrich, Deisenhofen
ECL Western Blotting detection reagents	Amersham Pharmacia, Freiburg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Fluka, Buchs (CH)
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Fluka, Buchs (CH)
Saccharose	Serva, Heidelberg
Trizma [®] Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma, Steinheim
Tween [®] 20 pure	Serva, Heidelberg

Alle weiteren Chemikalien wurden in p. a. Qualität von Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Für wässrige Lösungen und Puffer wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.1.3 Lösungen

10 x Tris-buffered Saline (TBS), pH 8.0

Für 1 Liter Lösung wurden 80g Natriumchlorid, 2g Kaliumchlorid und 610g Trizma in 800ml Milli-Q-Wasser gelöst. Anschließend wurde durch tropfenweises Hinzufügen von konzentrierter Salzsäure der pH auf 8.0 gebracht. Dann wurde mit Milli-Q-Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Im Vergleich zum SPOTs-Kit Handbuch ist dies die 10-fache Konzentration, so dass vor Versuchsbeginn mit Milli-Q-Wasser 1:10 verdünnt wurde.

Tris-buffered Saline/Tween (T-TBS), pH 8.0

Zu 1 Liter TBS wurden 0.5ml Tween 20 hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen konnte diese Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt und für die gesamte Versuchsdauer verwendet werden.

10 x Phosphate-buffered Saline (PBS), pH 7.3

Für 1 Liter Lösung wurden 81.8g Natriumchlorid, 2g Kaliumchlorid, 17.8g Na_2HPO_4 und 2.5g KH_2PO_4 in 800ml Milli-Q-Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH durch tropfenweises Hinzufügen von konzentrierter Salzsäure auf 7.3 gebracht. Schließlich wurde mit Milli-Q-Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Regeneration Buffer A (RBA)

Für die Herstellung von 1 Liter der Pufferlösung wurden 480.5g Harnstoff und 10g Natriumdodecylsulfat in 800ml Milli-Q-Wasser gelöst, was erst nach mehrstündigem Rühren gelang. Dann wurde mit Milli-Q-Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und 1ml 2-Mercaptoethanol zugefügt. Sowohl der letzte Arbeitsschritt als auch die Lagerung des RBA erfolgte an einem Arbeitsplatz mit geschlossener Abzugshaube. Alternativ wäre es auch möglich gewesen, Mercaptoethanol jeweils kurz vor Einsatz des Puffers zuzufügen. Aus Gründen der Praktikabilität wurde die erste Variante gewählt.

Regeneration Buffer B (RBB)

Für 1 Liter RBB wurden zunächst 400ml Milli-Q-Wasser mit 500ml Ethanol vermischt. Erst dann wurden noch 100ml Essigsäure hinzugegeben, da bei einem direkten Vermischen von Ethanol und Essigsäure mit einer stark exothermen Reaktion zu rechnen gewesen wäre.

1 M Magnesiumchlorid

Zur Herstellung wurden 2g Magnesiumchlorid-6-Hydrat in 10ml Milli-Q-Wasser gelöst und die Lösung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Blocking Buffer (BB)

Zu 90ml T-TBS pH 8.0 wurden 10ml GENOSYS konzentrierter Membran Blocking Buffer (GENOSYS Cat no. SU-07-250) und nach gründlichem Durchmischen zusätzlich 5g Saccharose gegeben.

Ferricyanid-Lösung

Diese wurde durch Lösen von 100mg Kalium-Ferricyanid in 1ml Milli-Q-Wasser hergestellt. Die Lösung wurde in 100ml-Portionen bei -20° C aufbewahrt.

Signalgebungslösung/Signal Developing Solution (SDS)

Für die Entwicklung einer Membran mit dieser Variante der SPOTs-Anfärbung wurden 10ml SDS-Lösung benötigt. Die wie oben hergestellte Ferricyanid-Lösung wurde aus der Gefriertruhe entnommen und zum Auftauen beiseite gelegt. In der Zwischenzeit wurden 4.9mg BCIG in 100µl DMF gelöst und diese Mischung in 10ml PBS gegeben. Dazu wurden 10µl Magnesiumchlorid und

100µl aufgetaute Ferricyanidlösung gegeben. Theoretisch hätte die so erzeugte SDS auch wieder eingefroren und ein weiteres Mal aufgetaut und verwendet werden können, jedoch wurde die SDS jeweils vor Verwendung frisch zubereitet.

2.1.4 Enzyme

Asparaginase medac®

Medac, Hamburg

2.1.5 SPOTs Membran (Sigma Genosys, The Woodlands, TX, USA)

Bei Lieferung ist die Membran sofort einsatzbereit. Jeder einzelne Spot ist durch Färbung mit Bromphenolblau einfach identifizierbar. Bei Gebrauch der Membran sollten stets Pinzette und Handschuhe verwendet werden. Die Membran sollte zur Konservierung immer bei -20 °C verwahrt werden.

2.1.6 Antiserum

Anti-Asparaginase-IgG, Kaninchen

Biomol, Hamburg

2.1.7 Aktive Fmoc-Aminosäure-Ester

Das Kit enthält jeweils 500mg Fmoc-geschützten Ester der 20 proteinogenen Aminosäuren. Für die meisten Aminosäuren reichte diese Menge völlig aus – die häufiger verwendeten (z. B. Alanin, Valin, Asparagin) mussten nachbestellt werden. Die Aufbewahrung zwischen den einzelnen Synthesetagen erfolgte bei -20 °C in der Gefriertruhe.

2.1.8 Probanden-Seren

Zur Gegenüberstellung von käuflich erhältlichem Anti-Asnase-IgG mit den Seren von gesunden, nie zuvor mit Asparaginase behandelten Probanden wurde zunächst von zwei Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Blut gewonnen.

Proband I: A. W., weiblich, 24 Jahre

Proband II: H.-J. M., männlich, 61 Jahre

2.1.9 Computerprogramme

SPOTs-Kit

Sigma Genosys,
The Woodlands, Texas (US)

Word 2000

Microsoft

Excel

Microsoft

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der Peptid Auswahl

Mit Hilfe des im Lieferumfang enthaltenen Computerprogramms wurde zunächst die komplette Sequenz der EcA2 erstellt. Zur Ermittlung der geeigneten Peptidlänge für die Synthese auf der Membran wurden hierzu mehrere Größenvarianten durchgespielt. Dabei fiel die Entscheidung auf eine Sequenz von 10 Aminosäuren mit einer Versetzung von jeweils 2 Aminosäuren. Dies entsprach 156 Spots auf 2 Membranen.

2.2.2 Entfernung freier Amine aus der DMF- (N,N-Dimethylformamid)

Lösung

Da sowohl DMF als auch NMP (1-Methyl, 2-Pyrolidinon) dazu tendieren, Aminogruppen freizusetzen, die später stören können, ist es essentiell, vor Verwendung der Lösungen sicherzustellen, dass sie so wenig freie Amine wie möglich enthalten. Um dies zu gewährleisten, wurden molekulare „Fallen“ der Firma Genosys verwendet, die im Vakuum versiegelte, aktivierte Molekularsiebe enthalten. Zunächst wurden die Siebe aus der Verpackung entnommen und jeweils eine Falle pro 100ml NMP und zwei per 4L DMF hinzugefügt. Unter gelegentlichem Umrühren wurden sie in den Flüssigkeiten für rund 72 Stunden belassen. Da dies nicht zu dem gewünschten Erfolg führte und durch Zugabe von Bromphenolblau-Lösung weiterhin freie Amine nachweisbar waren, wurden wie auch im Handbuch des SPOTs-Kit empfohlen freie Siebe (4Å Porengröße, 1.6 - 2mm Durchmesser, 8-11 Mesh) bei 260 °C 48h lang in einem Vakuumtrockner-Ofen erhitzt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur in die Lösung gegeben. Durch wiederholte Testungen der DMF- und NMP-Lösungen stellte sich heraus, dass für eine effektive Reinigung bis zu zwei Wochen nötig waren. Für die Zeit der Untersuchungen wurden deshalb die Siebe einfach in den Lösungen belassen und erst entfernt und erneuert, wenn die Testung erneut freie Aminogruppen anzeigte. Auch die angegebenen Mengen wurden erhöht.

DMF-Lösung (N,N-Dimethylformamid)

Die von Sigma gelieferte DMF-Lösung zeigte sich im Test nicht frei von Aminogruppen. Deshalb wurden, wie oben beschriebenen, die aktivierten und anschließend abgekühlten Siebe direkt in die DMF-Lösung gegeben (ungefähr 25% v/v). Nach mehrmaligem Wenden der Flasche und Zuwarten von einer guten Stunde erfolgte erneut die Testung der Lösung. Da sich nach wie vor keine gelbe Farbe zeigte, wurde – um den Prozess zu beschleunigen und nicht eine weitere Woche abwarten zu müssen – nach folgendem Protokoll die Reinigung der DMF-Lösung sichergestellt: In eine 50cm hohe und 6cm breite Glassäule mit geschliffenem Stopfen und Hahn wurden unter der Abzugshaube die wie oben beschrieben behandelten 4 Å-Siebe gegeben, so dass die Säule zu etwa $\frac{3}{4}$ gefüllt war. Darauf wurden 100ml der DMF-Lösung gegeben und nach kurzem Zuwarten das Eluat verworfen. Anschließend wurde erneut DMF-Lösung in die Säule gegossen und zwar diesmal so viel, dass der Oberflächenspiegel der Lösung in etwa 5cm über dem Sieb-Level lag. Das Ganze wurde mit dem Stopfen verschlossen und so für etwa zwei Stunden stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit und Entfernung des Stopfens wurde durch den Hahn am unteren Ende der Säule tropfenweise Flüssigkeit in ein Glasbehältnis abgelassen, bis auf diese Weise 50ml gereinigtes DMF gewonnen waren.

NMP-Lösung (1-Methyl, 2-Pyrolidinon)

Im Gegensatz zu den großen Mengen an DMF, die pro Syntheszyklus benötigt werden, wird nur wenig NMP gebraucht. Auch hier wurden die Siebe nach ordnungsgemäßer Aktivierung und Abkühlung direkt in die NMP-Lösung gegeben (ungefähr 25% v/v) und nach mehrfachem Schütteln des Gefäßes sowie einer Einwirkzeit von etwa 1h auf freie Amine überprüft. Da sich auch hier die Lösung zunächst nicht gelb verfärbte, wurde die NMP-Lösung ebenfalls über die Säule eluiert. Hierzu wurde wiederum eine wie oben beschriebene Glassäule verwendet und diese ebenfalls mit wie zuvor beschriebenen aktivierten 4Å-Sieben (in diesem Fall 150g) befüllt, auf die 150ml NMP gegeben und im verschlossenen Behältnis für 48h belassen wurden. Dann wurde der Stopfen wieder entfernt und zunächst ein Volumen von 50ml verworfen. Anschließend wurden 20ml aus der Glassäule eluiert und nach Überprüfung mit

Testlösung für die Versuche verwendet. Die restliche Menge NMP aus der Säule wurde in eine andere lichtgeschützte Glasflasche abgelassen, in die zuvor eine 2.5cm hohe Schicht von aktivierten 4Å-Molekularsieben gegeben worden war, und so bei Raumtemperatur verwahrt.

2.2.3 Vorbereitungen für die Bromphenol-Blau(BB)-Testlösung

Zur Herstellung der BB-Testlösung wird DMF benötigt, welches frei von Aminen sein muss. Um dies zu garantieren, erfolgte die erste Testung mit 10ml des gelieferten DMF, zu dem 1mg Bromphenol-Blau gegeben wurde. Da sich zunächst keine Gelbfärbung einstellte und somit von noch vorhandenen freien Aminogruppen ausgegangen werden musste, erfolgte die Reinigung gemäß der oben beschriebenen Anleitung.

2.2.4 Herstellung der 1%igen BB-Testlösung

In ein kleines Glasfläschchen wurden zu 100mg Bromphenolblau 10ml des wie oben beschrieben vorbereiteten und gereinigten DMF gegeben. Hierbei wurde die säurefreie Form vom BB gewählt, um eine Verunreinigung mit Natriumsalzen ausschließen zu können. Nach gründlichem Durchmischen nahm die Flüssigkeit einen satten Orange-Ton an. Fest verschlossen konnte die Lösung unter dem Abzug bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Sobald sich im Laufe der Versuche die Lösung grünlich-bläulich verfärbte, wurde neue BB-Testlösung präpariert.

2.2.5 Bromphenol-Blau-Test für DMF- und NMP-Lösung

Zur Überprüfung, ob die DMF- und NMP-Lösungen noch funktionstüchtig und damit für die Membran verwendbar sind, wurde zu 1ml der jeweiligen Lösung 10µl der hergestellten 1%igen Bromphenol-Blau-Lösung gegeben und das Gemisch gründlich zentrifugiert. Nach 5min zeigte ein klares Gelb die weitere Verwendbarkeit an, wohingegen bei grünlicher oder bläulicher Verfärbung die DMF- und NFP-Lösungen verworfen und neu angesetzt werden mussten.

2.2.6 Herstellung der 20%igen Piperidin/DMF-Lösung

80ml gereinigter DMF-Lösung wurden in eine Glasflasche gegeben und mit 20ml Piperidin vermischt. Zwischen den einzelnen Gebrauchsschritten wurde die Lösung unter dem Abzug bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.7 Präparation der aktiven Fmoc-Aminosäure-Ester

Die Fmoc-Aminosäuren werden in Form ihrer Pentafluorophenyl- oder N-hydroxy-oxo-dihydrobenzotriazin-Ester geliefert und waren sofort einsatzbereit. Mit Ausnahme des Argininderivats sind alle Fmoc-Aminosäureester relativ stabil, was eine Aufbewahrung bei -70 °C ermöglicht. Zunächst wurden Sets zu je vier Eppendorf-Röhrchen pro Aminosäure mit dem Buchstaben der jeweiligen Aminosäure gekennzeichnet. Währenddessen konnten die zuvor aus der Gefriertruhe entnommenen Aminosäure-Derivate auftauen. Diese wurden dann in entsprechend gekennzeichneten Eppendorf-Röhrchen, wie in folgender Tabelle 2.1 dargestellt, abgewogen:

Fmoc-Aminosäure-Derivate	Menge (mg)	Fmoc-Aminosäure-Derivate	Menge (mg)
A – Ala	28.60	L – Leu	31.20
C – Cys	45.00	M – Met	32.25
D – Asp	34.70	N – Asn	31.25
E – Glu	71.00	Q – Gln	32.20
G – Gly	27.80	R – Arg	12.40
H – His	38.00	S – Ser	31.70
P – Pro	30.20	T – Thr	32.60
I – Ile	31.20	W – Trp	35.60
K – Lys	38.10	Y – Tyr	37.50

Tab 2.1 Menge der zu verwendenden Aminosäuren

Zu den einzelnen Aminosäure-Estern wurde nach dem Abwiegen jeweils 200µl gereinigtes NMP gegeben. Nach gründlichem Durchmischen mit Hilfe eines Vortex-Mixers wurden je 50µl der Lösung in die verbleibenden drei weiteren Eppendorf-Röhrchen pipetiert, so dass dadurch viermal 50µl einsatzbereiter Fmoc-Aminosäure-Ester zur Verfügung standen. Jeweils drei Sets wurden im Gefrierfach bei -70 °C verwahrt, während das verbleibende für die Synthese an Tag 1 genutzt wurde. Dies funktionierte jedoch aufgrund von Instabilität nicht mit der Aminosäure Arginin, so dass diese immer direkt vor dem Einsatz abgewogen und gelöst werden musste.

2.2.8 Vorbereitungen vor der Peptidsynthese

Pro Zyklus werden für eine SPOTs-Membran etwa folgende Mengen benötigt:

DMF	400ml
Methanol	100ml
20% Piperidin/DMF	30ml
1% BB-Lösung	400µl
Aminosäure/NMP-Lösung	2µl pro Punkt

Wie bereits erwähnt, wurden 159 Punkte benötigt, was bei 96 Spots per Membran etwa $1\frac{3}{4}$ Membranen entsprach. Zur ersten Vorbereitung wurden diese dazu aus der Kühltruhe entfernt und auf Raumtemperatur aufgetaut. Eine der beiden Membranen wurde mit Hilfe einer Schere auf die verbleibenden 63 Punkte zurechtgeschnitten. Mit einem weichen Bleistift wurden die Spots durchnummeriert. Da nur ein speziell beschichteter Trog zur Verfügung stand, wurden die Membranen nacheinander synthetisiert.

2.2.9 Peptid-Synthese

Grundsätzlich erfolgten alle Schritte auf einer Schüttelplatte und an einem Arbeitsplatz mit Abzugshaube. Falls es sich nicht um Tag 1 handelte und die Aminosäurederivate ohnehin frisch zubereitet worden waren, wurden sie vor Öffnen der Röhrchen erst auf Zimmertemperatur aufgetaut. Die zu bearbeitende Membran wurde in den entsprechenden Trog gelegt. Gemäß der vom Programm erstellten Pipetieranweisung wurde zunächst mit Fmoc-β-Alanin als erstem Anker-Rest begonnen.

Beispielhaft für das Pipetierschema sind die ersten beiden Zyklen der ersten Membran in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Schedule for cycle #1	
A	3, 6, 15, 19, 31, 44, 53, 62, 64, 66, 67, 93, 110, 111, 113, 117, 125, 126, 129, 137, 147
R	54, 68, 75, 132
N	8, 13, 27, 33, 60, 78, 88, 107, 119, 120, 145, 158
D	5, 18, 26, 28, 34, 35, 41, 46, 49, 58, 65, 72, 74, 90, 96, 98, 139
E	43, 101
Q	22, 91, 136, 146, 152, 155, 156
G	1, 4, 10, 21, 37, 40, 86, 115, 128, 134, 141
I	24, 87, 104, 157
L	17, 100, 109, 149, 150, 151
K	7, 32, 48, 77, 82, 89, 94, 127, 140, 153
M	42, 71
F	45, 123
P	16, 50, 59, 85, 97, 102, 133, 154
S	25, 55, 56, 57, 99, 108, 131, 143
T	2, 9, 30, 36, 39, 47, 79, 81, 92, 95, 122, 124, 135, 144
W	29
Y	61, 84, 105, 106, 114, 121, 159
V	11, 12, 14, 20, 23, 38, 51, 52, 63, 69, 70, 73, 76, 80, 83, 103, 112, 116, 118, 130, 138, 142, 148

Schedule for cycle #2	
A	10, 58, 65, 81, 107, 108, 127, 135, 140, 143, 151
R	92, 94, 131, 148
N	15, 20, 24, 62, 68, 72, 84, 101, 106, 128
D	28, 37, 76, 80, 109, 113, 115, 124, 137, 139, 154
C	35, 49
E	13, 22, 43, 138
Q	17, 26, 150, 155, 157, 159
G	2, 4, 5, 12, 25, 53, 59, 69, 75, 85, 89, 104, 114, 118, 119, 120, 144
H	40, 88, 95
I	3, 19, 33, 39, 90, 116, 156
L	14, 30, 31, 46, 47, 61, 70, 74, 86, 102, 112, 121, 125, 145, 149
K	11, 18, 21, 32, 36, 50, 66, 100, 103, 111, 122, 147
M	27, 52, 54, 57
F	38, 60, 82, 98, 142, 158
P	55, 93, 110, 146
S	6, 8, 67, 83, 96, 117, 132
T	1, 7, 34, 41, 42, 44, 56, 64, 73, 77, 78, 79, 97, 126, 129, 134, 136, 152, 153
Y	9, 45, 87, 91, 141
V	16, 23, 29, 48, 51, 63, 71, 99, 105, 123, 130, 133

Tab 2.2 Synthesepäne („Schedule“) Durchgang 1 und 2, Membran I

Hierzu wurden jeweils 0.9µl der Fmoc-Aminosäure-Ester-Lösung auf jeden Spot aufgebracht, der für diese Aminosäure aufgeführt war. Dabei wurde darauf geachtet, dass beim Auftippen der Pipettenspitze auf die Membran diese nicht beschädigt wurde.

Jene Prozedur wurde für alle Aminosäuren mit Ausnahme des instabilen Arginins wiederholt, wobei aus Sicherheits- und Reinheitsgründen die Pipettenspitze nicht nur von der jeweils einen zur anderen Aminosäure gewechselt wurde, sondern aufgrund des Berührens der Membran zum Abtropfen nach dem ersten Zyklus auch von einem Spot zum nächsten, um etwaige Kontamination durch bereits zuvor an diesem Punkt aufgetragene Aminosäure auszuschließen. Nach Auftragen aller anderen Aminosäurederivate wurde der Fmoc-Ester des Arginins direkt hergestellt. Nach Abwiegen von 12.4mg des aktiven Esters wurden 50µl gereinigtes NMP zugefügt und nach gutem Durchmischen zügig jeweils 0.9µl pro Punkt auf die zugehörigen Spots pipetiert. Sobald alle Aminosäurederivate verteilt waren, wurde der Trog mit dem Glasdeckel verschlossen und für 15min belassen. Dann wurde der Deckel wieder entfernt und der gesamte Pipetivorgang wie oben beschrieben erneut durchgeführt. Hierbei konnte das für den ersten Durchgang hergestellte Argininderivat ein zweites Mal verwendet werden. Die zweifache Pipettierung diente hierbei zur größeren Sicherheit, um eine möglichst gleichmäßige Menge an Peptid pro Spot garantieren zu können.

Durch die stattfindende Kopplungsreaktion veränderten sich die Spots farblich. Die zunächst bläuliche Farbe, die durch BB in Anwesenheit von freien Aminogruppen der ungeschützten Aminosäuren zustande kommt, wandelte sich je nach Spot ins Gelbliche oder Grünliche. Während der 15min, in denen die Membran in der verschlossenen Truhe ruhte, wurden die Aminosäure-Lösungen bei -20 °C gelagert, um sie für spätere Zyklen am selben Tag erneut verwenden zu können. Vor Hinzugeben der ersten Lösung wurde die Truhe mit Membran auf eine Schüttelplatte unter eine Abzugshaube platziert. Zunächst wurden dreimal 20ml DMF für 2min in die Truhe gegeben, wobei nach dem dritten Waschgang das DMF nicht anschließend abgeschüttet wurde, sondern 800µl Essigsäureanhydrid (EA) hinzu gegeben wurden. Diese Membran-Acetylierung ist notwendig, um einerseits freie Aminosäuren, welche nicht

gekoppelt wurden, zu blockieren und somit ein weiteres Reagieren auszuschließen, zum anderen aber auch, um die Bildung von Sequenzen zu verhindern, die zu einem Kettenabbruch führen würden.

Die Acetylierung ist abgeschlossen, sobald alle blaue Farbe von den Spots verschwunden ist. Gerade bei den ersten Zyklen gelang dies nicht augenblicklich, weshalb der im Handbuch vorgegebene Weg, nach 25min weitere 300µl EA zuzufügen, eingeschlagen wurde, der dann zu einer Punkt-Entfärbung führte. Nach vollständiger Entfärbung aller Spots wurde die Flüssigkeit abgeschüttet und der Waschprozess nach folgendem Schema ausgeführt.

Zunächst wurden dreimal je 20ml DMF für 2min zugegeben; anschließend für 5min 20ml der 20%-igen Piperidin/DMF-Lösung und dann wiederum 20ml DMF für 2min - allerdings diesmal 5-mal. Dann wurden 200µl 1%iger BB-Lösung zu 20ml DMF gegeben und dieses Gemisch wiederum auf die Membran aufgebracht. Die Spots sollten hierbei blau werden, die restliche Membran weiß und die Lösung gelblich. Allerdings kam es immer zu einer augenblicklichen Blaufärbung der Lösung. Deshalb wurde – dem Handbuch folgend – die Lösung sofort abgegossen und der letzte Teil der Waschung (5-mal 20ml DMF für je 2min; 200µl 1%-ige BB-Lösung in 20ml DMF) wiederholt. Mehrfache Versuche zeigten, dass die einzige Möglichkeit, die gewünschte Farbänderung (Spots blau, Membran weiß, Lösung gelb) herbeizuführen, darin bestand, die Membran massiv mit DMF zu waschen (gewähltes Schema: 10s-10s-30s-30s-1min-1min-5min-5min-10min-15min-30min) und dann die letzten 20ml über Nacht auf der Membran und der Rüttelplatte zu belassen. Auf diese Weise gelang es, das gewünschte Ergebnis zu erzielen, jedoch brachte dies den zeitlichen Nachteil mit sich, dass pro Tag jeweils nur ein Zyklus synthetisiert werden konnte. Aus diesem Grund wurden für die Herstellung einer Membran 10 Tage benötigt und der Materialaufwand insbesondere bezüglich der Aminosäurederivate vergrößerte sich erheblich.

Am jeweiligen nächsten Morgen wurde nach Abgießen der über Nacht belassenen DMF-Lösung 200µl 1%ige BB-Lösung in 20ml DMF zugegeben und 5min darin belassen. Hierbei färbten sich die Spots blau und die Lösung konnte abgegossen werden. Zum Abschluss wurden noch dreimal je 20ml Methanol in

den Trog gegeben und nach je 2min wieder abgegossen. Anschließend wurde die Membran in ein gefaltetes Löschpapier gepackt und mit einem Haartrockner auf Kühlstufe getrocknet. Danach war sie wieder bereit für den nächsten Pipetierzyklus.

Die oben beschriebene Prozedur wurde für neun der zehn Zyklen durchgeführt. Für den jeweils letzten Zyklus galten neben dem zweimaligen Aufbringen der Aminosäure-Ester nur die ersten DMF-Waschschritte (20ml DMF dreimal für je 2min). Anschließend wurde für die finale Acetylierung etwas anders verfahren.

2.2.10 Acetylierung

Zunächst wurden auf die Membran 20 ml 20%-iges Piperidin/DMF gegeben und das Ganze auf der Schüttelplatte 5min durchmischt. Dann wurde diese Lösung gegen 20ml DMF ausgetauscht, welches 2min auf der Platte belassen wurde. Dieser Schritt wurde noch viermal wiederholt. Nun wurden wieder 200µl 1%-ige BB-Lösung mit 20ml DMF vermischt und zur Membran gegeben. Auch hier war wieder das oben beschriebene komplizierte Waschverfahren über Nacht notwendig. Sobald sich am nächsten Tag das gewünschte Ergebnis einstellte, wurde mit der Acetylierung fortgefahren. Hierzu wurde ein Gemisch von 400µl Essigsäureanhydrid in 20ml DMF auf die Membran gegeben. Da sich auch nach ca. 15min noch keine Entfärbung eingestellt hatte, wurde die Lösung abgegossen und frisches Essigsäureanhydrid/DMF-Gemisch zugefügt. In beiden Fällen (Membran I und II) war daraufhin nach spätestens 3min die geforderte Entfärbung eingetreten. Nach Abgießen dieser Lösung wurde die Membran dreimal je 2min lang mit 20ml DMF und anschließend dreimal je 2min lang mit 20ml Methanol gewaschen. Dann wurde die Membran mit einer Pinzette in ein gefaltetes Löschblatt gegeben und wie oben gründlich getrocknet.

Da die nun anstehende Seitenkettenschutz-Entfernung weder bei Membran I noch bei Membran II am selben Tag durchgeführt werden konnte, wurden die Membranen jeweils über Nacht bei -20 °C in die Gefriertruhe aufbewahrt.

2.2.11 Entfernung des Seitenkettenschutzes

Dieser Schritt sollte unbedingt unter einem Abzug erfolgen und beim Umgang mit Trifluor-Essigsäure (TFA) muss besondere Vorsicht eingehalten werden.

Nachdem die Membran synthetisiert und acetyliert war, mussten nun die Schutzgruppen an den Seitenketten der Aminosäure entfernt werden, hierfür wurde zunächst die Membran aus der Gefriertruhe entnommen, in Methanol gespült und durch Kaltluft gründlich getrocknet. Dann wurde sie wieder in die ebenfalls gut gesäuberte und getrocknete Polypropylen-Box gelegt. 5ml Dichlormethan wurden mit 5ml TFA versetzt und mit 200µl Triisobutyl-Kochsalzlösung gemischt. Die Mischung wurde sofort zur Membran in die Box gegeben, die Truhe mit dem dazugehörigen Glasdeckel gut verschlossen und für 1 Stunde auf der Rüttelplatte belassen. Daraufhin wurde die Lösung wieder abgegossen, wobei dabei darauf zu achten war, dass es bei der Entsorgung zu keinem versehentlichen Zusammentreffen von TFA und DMF-Abfall kam, da diese beiden Lösungen stark exotherm miteinander reagieren und somit explosive Reaktionen auftreten können.

Zum Abschluss wurde die Membran für jeweils 2min mit viermal 20ml Dichlormethan, dreimal 20ml DMF und dreimal 20ml Methanol gewaschen. Danach war die Membran fertig synthetisiert und für den Antikörper-Bindungs-Assay bereit. Da dies nicht am selben Tag erfolgen konnte, wurde die Membran wieder durch Löschpapier und Kaltluft getrocknet und in einer verschließbaren Plastiktüte bei -20 °C in der Gefriertruhe verwahrt.

2.2.12 Inkubation mit Antikörpern

Zur Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran aus dem Gefrierfach entnommen und nach Auftauen auf Raumtemperatur vorsichtig in der dazugehörigen Kunststoffbox mit Methanol gespült. Anschließend wurde sie dreimal mit je 10ml TBS bedeckt und jeweils 10min lang auf der Schüttelplatte inkubiert. Nach dem letzten Abgießen wurden 20ml Blocking Buffer auf die Membran gegeben und die Box über Nacht (ca. 12 Stunden) auf der Schüttelplatte belassen. Am folgenden Tag wurde der TBS-Puffer abgegossen und die Membran 10min mit 20ml T-TBS behandelt. In dieser Zeit wurde die Antikörper-Testlösung hergestellt. Hierzu wurden 20µl des Test-Antikörpers in 20ml Blocking Buffer pipetiert und das Gemisch zur besseren Vermengung 5min in einen Vortex-Mixer gehalten. Nach Abschütten des T-TBS aus der

Truhe wurde die Antikörper-Testlösung auf die Membran gegeben und das Ganze 4 Stunden auf der Schüttelplatte inkubiert.

Vor Zugabe des Zweit-Antikörpers wurde erneut dreimal je 10min lang mit 20ml T-TBS gewaschen. Die optimale Verdünnung des Zweitantikörpers wurde durch Vorversuche ermittelt. Dabei zeigte es sich, dass 4 μ l Antikörperlösung in 20ml BB die besten Detektions-Ergebnisse brachten. Nach 2 Stunden Inkubation mit dieser Mischung wurde wieder viermal mit jeweils 20ml T-TBS gewaschen (2, 5, 15 und nochmals 15min).

Um unspezifische Reaktionen der Membran mit dem β -Galaktosidase-konjugierten Antikörper erkennen zu können, wurde beim ersten Durchgang der Test-Antikörper weggelassen und die Membran lediglich mit Zweit-Antikörper-Lösung inkubiert.

Als Antikörper wurden käuflich erhältliche, gereinigte Anti-Asparaginase IgG vom Kaninchen gewählt. In einem zweiten Schritt wurde auch das Serum von zwei Probanden aus dem Labor gescreent. Hierbei erfolgte eine gängige venöse Blutentnahme mit anschließender Abzentrifugation der korpuskulären Bestandteile. Das überstehende Serum wurde dann für den Einsatz auf der Membran verwendet.

2.2.13 Kolorimetrische Detektion

Die Bindung von Antikörpern an die Membran wurde mit Signalgebungslösung (SDS) sichtbar gemacht. Dazu wurden 10ml frisch zubereitete SDS gut durchgeschüttelt und auf die Membran gegeben. Die Truhe mit Membran und Lösung wurde anschließend auf der Schüttelplatte platziert und dort etwa 30min belassen, bis sich blaue Spots zeigten. Dann wurde die SDS abgegossen und die Membran zweimal 10min mit 20ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die gefärbte Membran photographisch dokumentiert.

Danach erfolgte die Regeneration der Membran wie unten beschrieben.

Da sich mit der kolorimetrischen Methode keine zufrieden stellenden Ergebnisse erzielen ließen, wurde im Folgenden das Chemilumineszenz-Verfahren angewendet.

2.2.14 Chemilumineszenz-Detektion

Zur Detektion der durch Erst- und Zweit-Antikörper markierten Proteinbanden wurde die ECL-Methode verwendet (ECL: *enhanced chemiluminescence*: Verstärkte Chemilumineszenz). Dabei reagiert die an den Zweit-Antikörper gebundene Peroxidase unter Lichtemission mit dem Reagenz Luminol. Die Reaktion wird mit Phenolderivaten zusätzlich verstärkt und anschließend durch Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht. Zur Belichtung und Entwicklung des Films wurde das Amersham ECL Western Blotting Analysis System nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Vorbereitung der Membran wurde nach Abgießen der letzten T-TBS-Lösung das Substrat, bestehend aus gleichen Teilen von je 7,5ml Luminol/Enhancer und Peroxid-Puffer auf die Membran gegeben. Nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Belichtungszeiten erwies sich eine Belichtung von 1,5min als optimal.

Anschließend wurde die Membran nach folgendem Schema regeneriert:

2.2.15 Regeneration der Membran

Nach gründlichem Ausspülen der Kunststoff-Box mit Milli-Q-Wasser wurde die Membran wieder hineingelegt und mit dreimal 20ml Milli-Q-Wasser jeweils 10 min unter Schütteln gewaschen. Dann wurde mit dreimal 20ml DMF und zweimal 20ml Milli-Q-Wasser für jeweils 10min gewaschen. Zur Regeneration wurde dreimal je 10min lang mit den Regenerationspuffern A und B regeneriert. Abschließend wurde noch zweimal mit je 20ml Methanol für 10min nachgespült und die Membran anschließend aus ihrem Behälter genommen. Nach erstem Trocknen durch Löschpapier wurde durch einen Fön auf mittlerer Temperaturstufe die endgültige Trocknung durchgeführt. Danach wurde die Membran in einer verschließbaren Plastiktüte bei -20°C in der Kühltruhe gelagert.

3. Ergebnisse

Mit Hilfe der SPOTs-Technik wurden lineare Peptidsequenzen auf einer Zellulose-Membran synthetisiert und als Antigene eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden auf zwei Membranen insgesamt 159 Decapeptide hergestellt, die – um jeweils zwei Aminosäuren versetzt – die komplette EcA2-Sequenz abdecken. Die so hergestellten Membranen wurden mit einem polyklonalen Anti-EcA2-Antiserum sowie zwei Probandenseren gescannt um Hinweise auf Epitope der *E. coli*-Asnase zu erhalten. In den folgenden Abschnitten sind zunächst die belichteten Filme der einzelnen Membranen dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Scans findet sich in Tabelle 3.1.

3.1 Roh-Scan der Membranen

Um sicher zu stellen, dass keine der Membranen verunreinigt war, wurde im ersten Durchgang die Membran ohne Zugabe von Test-Antikörper untersucht. In beiden Fällen zeigte sich bei der Chemilumineszenz-Detektion keine Schwärzung des Films.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Chemilumineszenz-Färbung kam es zur Sättigung vieler Spots. Zur besseren Auswertung wurde deshalb immer mit der weniger sensitiven aber auch weniger störanfälligen kolorimetrischen Methode verglichen, um die Spots mit der intensivsten Färbung sicher zu identifizieren.

Diese Daten sind hier nicht im Einzelnen wiedergegeben.

3.2 Scan der Membranen mit Anti-EcA2-IgG (Kaninchen)

3.2.1 Membran I

Die Membran I enthielt die Peptide 1 bis 96, entsprechend der EcA2 Sequenz 1-193. Gescannt wurde mit der IgG eines polyklonalen gegen EcA2 gerichteten Kaninchen-Antiserums. Wie in Abb. 3.1 dargestellt, war eine Reihe sehr starker Signale zu erkennen, die – wie dies bei einer Peptidlänge von 10 Resten zu erwarten ist – jeweils bei 2-5 benachbarten Spots auftreten.

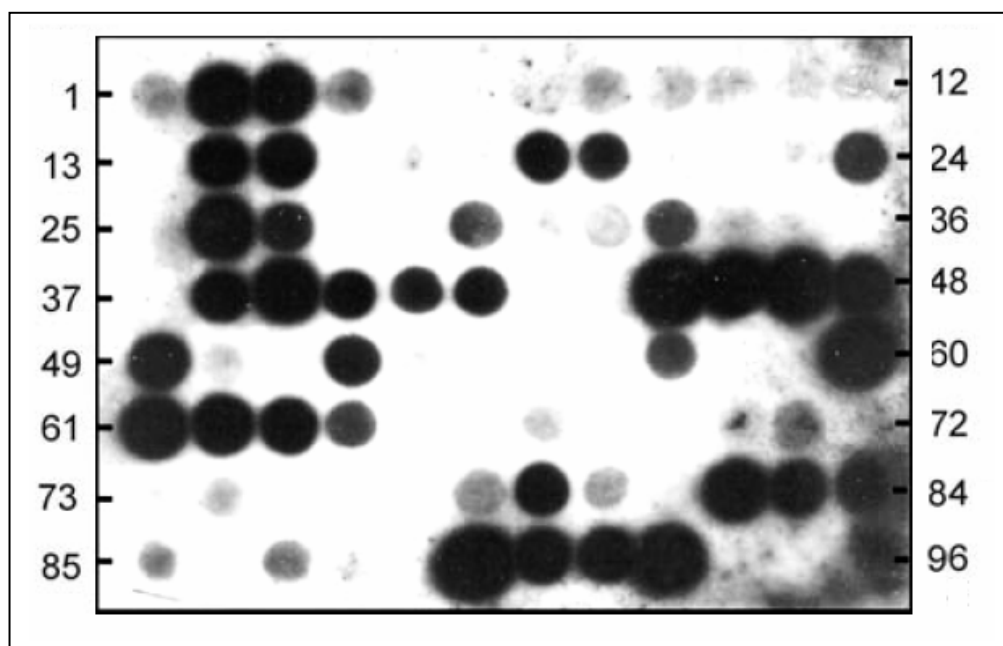


Abb. 3.1 Chemilumineszenz-Auswertung von Membran I nach Screening mit Anti-EcA2-IgG (Kaninchen)

Am stärksten färbten sich hierbei die SPOTs 2, 3, 14, 15, 19, 20, 24, 26, 27, 38, 39, 45, 46, 47, 48, 49, 52, 60, 61, 62, 63, 64, 79, 82, 83, 84, 90, 91, 92, 93.

3.2.2 Membran II

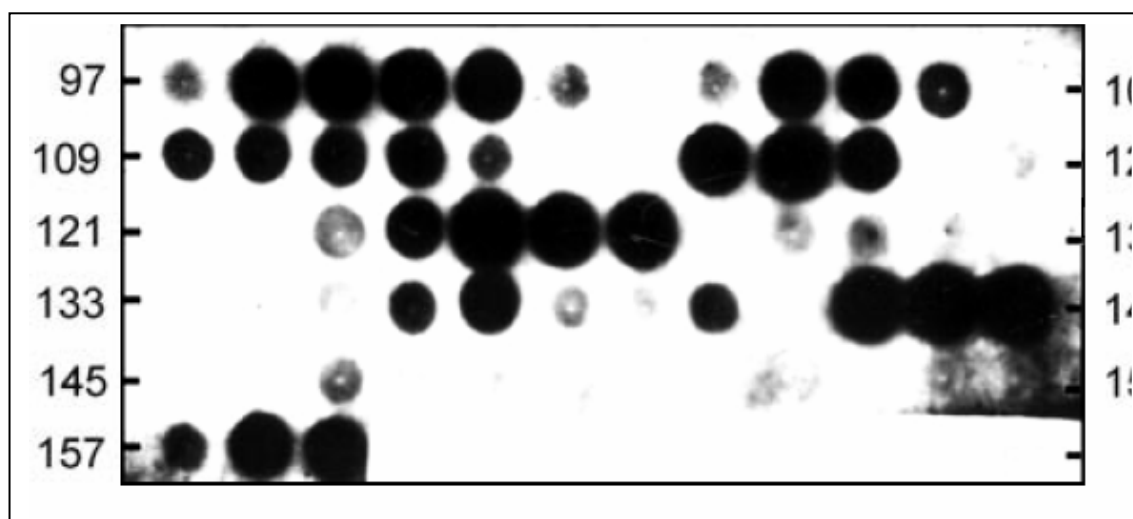


Abb. 3.2 Chemilumineszenz-Auswertung von Membran II nach Screening mit Anti-EcA2-IgG (Kaninchen)

Auch hier kam es zu starken Signalen in zahlreichen Spots.

Insbesondere die SPOTs 98, 99, 100, 101, 105, 106, 110, 11, 112, 116, 117, 118, 125, 126, 127, 142, 143, 144, 158, 159 wiesen eine deutliche Färbung auf.

3.3 Scan mit humanen Seren

Nach Abschluss der Scan-Reihen mit der IgG eines polyklonalen, gegen EcA2 gerichteten Kaninchen-Antiserums (PKA) wurden zusätzlich beide Membranen mit zwei unterschiedlichen humanen Seren (Proband A.W., Proband H.-J.M.) gescannt. Dies geschah zum einen vor dem Hintergrund, dass die Methode letztlich für das Screening humaner Seren gedacht ist. Zum anderen aber vor allem, um die mithilfe des PKA gewonnenen Ergebnisse denen von zwei Probanden gegenüberzustellen, die bisher noch keinen Kontakt mit L-Asparaginase hatten.

3.4 Serum des Probanden A.W.

3.4.1 Membran I

Die Lumineszenzfärbung ergab das in Abb. 3.3 dargestellte Bild, wobei die Nummerierung der Spots dieselbe ist wie in Abb. 3.1.

Am stärksten färbten sich hier die SPOTs 21, 32, 33, 67, 82, 94, 96 an.

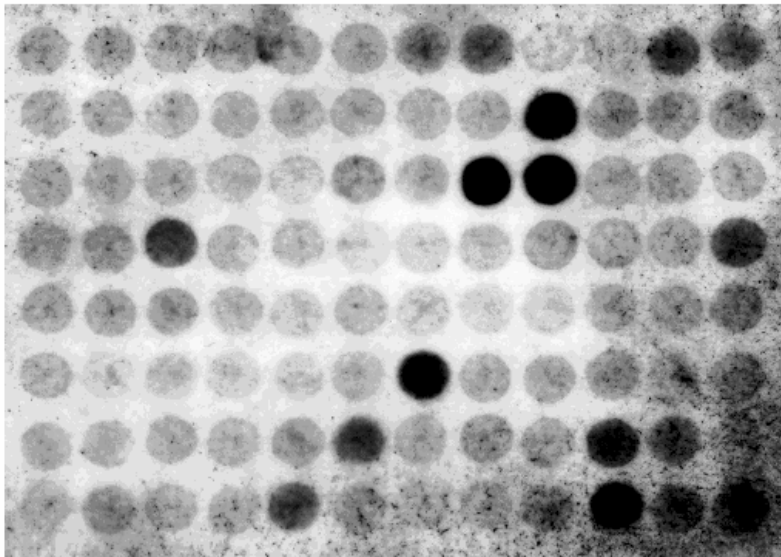


Abb. 3.3 Chemilumineszenz-Auswertung von Membran I nach Screening mit Serum Proband A.W.

3.4.2 Membran II:

Die Membran-Anfärbung ergab folgendes Bild:

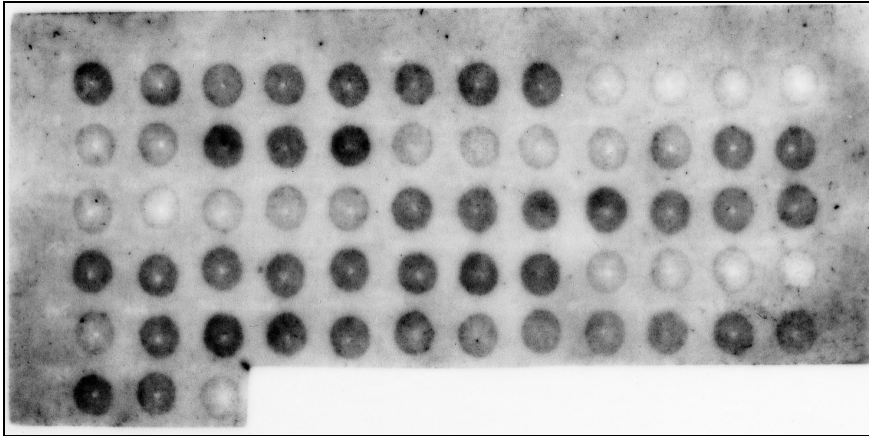


Abb. 3.4 Chemilumineszenz-Auswertung von Membran II nach Screening mit Serum Proband A.W.

Die dazugehörigen, am stärksten angefärbten SPOTs waren 97, 101, 102, 103, 104, 111, 112, 113, 133, 147, 157.

3.5 Scan der Membranen mit Serum des Probanden H.- J. M.

3.5.1. Membran I

Aufgrund von starker Hintergrundanfärbung gestaltete sich die Auswertung besonders von Membran I als äußerst schwierig; eine Unterscheidung jenseits von mindestens einfach positiv war kaum möglich. Dennoch ließen sich die stark positiven Spots (21, 32, 33, 67, 78, 82, 94) eindeutig identifizieren.

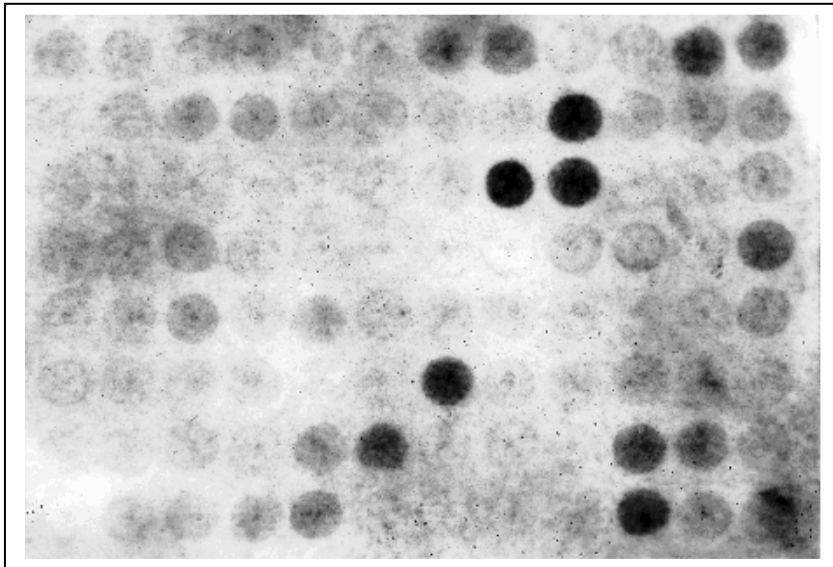


Abb. 3.5 Chemilumineszenz-Auswertung von Membran I nach Screening mit Serum Proband H.-J.M.

3.5.2 Membran II

Obwohl die Hintergrund-Verfärbung nicht so ausgeprägt war wie bei der ersten Membran, bereitete es auch hier Schwierigkeiten, die genaue Auswertung durchzuführen. Deshalb werden auch bei dieser zweiten Membran nur die eindeutig zweifach positiven Spots aufgeführt: 103, 104, 111, 112, 122, 129, 147, 148, 153, 157, 158.

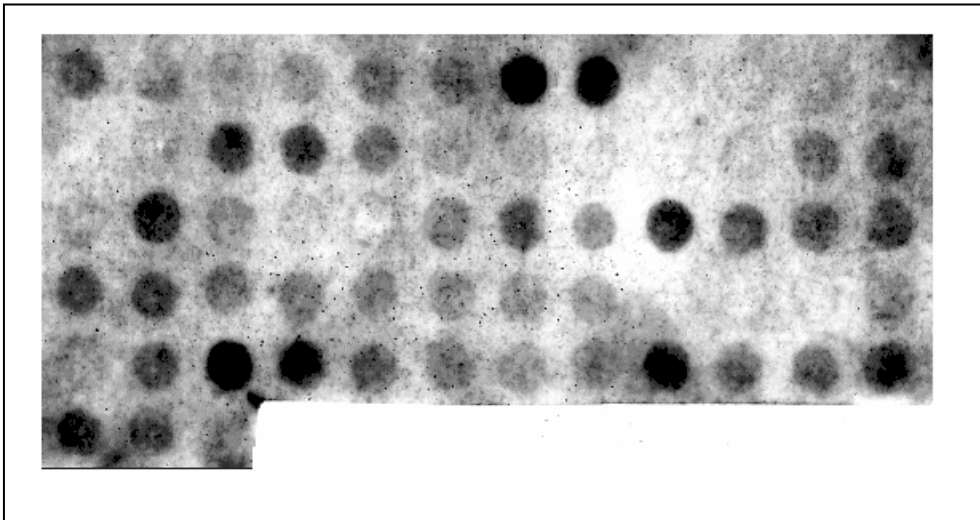


Abb. 3.6 Chemilumineszenz-Auswertung von Membran II nach Screening mit Serum Proband H.-J.M.

3.6 Tabellarische Gegenüberstellungen der Ergebnisse

Eine Gegenüberstellung aller SPOTs-Anfärbungen findet sich in Tabelle 3.1.

Nr.	Sequenz	PKA	AW	HJM				
1	LPNITILATG	+	-		51	LTVKCDKPVV	-	-
2	NITILATGGT	++	-		52	VKCDKPVVMV	++	-
3	TILATGGTIA	++	-		53	CDKPVVMVGA	+	-
4	LATGGTIAGG	+	-		54	KPVVMVGAMR	-	-
5	TGGTIAGGGD	-	-		55	VVMVGAMRPS	-	-
6	GTIAGGGDSA	-	-		56	MVGAMRPSTS	-	-
7	IAGGGDSATK	(+)	+		57	GAMRPSTSMS	+	-
8	GGGDSATKSN	+	+		58	MRPSTSMSAD	-	-
9	GDSATKSNYT	(+)	-		59	PSTSMSADGP	-	-
10	SATKSNYTAG	(+)	-		60	TSMSADGPFN	++	(+)
11	TKSNYTAGKV	(+)	+		61	MSADGPFNLY	++	-
12	SNYTAGKVG	(+)	+		62	ADGPFNLYNA	++	-
13	YTAGKVGVEN	-	-		63	GPFNLYNAV	++	-
14	AGKVGVENLV	++	-		64	FNLYNAVVTA	++	-
15	KVGVENLVNA	++	-		65	LYNAVVTAA	-	-
16	GVENLVNAV	-	-		66	NAVVTAAK	-	-
17	ENLVNAVQL	(+)	-		67	VVTAAKASA	+	++
18	LVNAVQLKD	-	-		68	TAADKASAN	-	-
19	NAVQLKDIA	++	-		69	ADKASANRG	-	-
20	VPQLKDIAN	++	-		70	KASANRGVL	(+)	-
21	QLKDIANVK	(+)	++	++	71	SANRGVLV	+	-
22	KDIANVKGE	-	-		72	NRGVLVVM	(+)	(+)
23	IANVKGEQV	(+)	-		73	GVLVVMND	(+)	-
24	NVKGEQVNI	++	(+)		74	LVVMNDTV	(+)	-
25	KGEQVVNIG	-	-		75	VMNDTVLD	-	-
26	EQVVNIGSQ	++	-		76	NDTVLDGR	-	-
27	VVNIGSQDM	++	-		77	TVLDGRDVT	(+)	-
28	NIGSQDMND	-	-		78	LDGRDVTKT	+	+
29	GSQDMNDD	-	-		79	GRDVTKTNT	++	-
30	QDMNDDVLT	+	(+)		80	DVTKTNTTD	+	-
31	MNDDVLTLA	(+)	-		81	TKTNTTDV	-	-
32	DDVLTTLAK	(+)	++	++	82	TNTTDVATF	++	++
33	VVLTTLAKK	+	++	++	83	TTDVATFKS	++	+
34	LTLAKKINT	(+)	-		84	DVATFKSVNY	++	-
35	LAKKINTDC	(+)	-		85	ATFKSVNYG	+	-
36	KKINTDCDK	-	-		86	FKSVNYG	-	-
37	INTDCDKTD	-	-		87	SVNYG	+	-
38	TDCDKTDGF	++	-		88	NYG	(+)	-
39	CDKTDGFVI	++	+		89	GPLGYIHNG	-	+
40	KTDGFVITH	+	-		90	LG	++	-
41	DGFVITHGT	+	-		91	YIHNGKIDY	++	-
42	FVITHGTDT	+	-		92	HNGKIDYQRT	++	-
43	ITHGTDTME	-	-		93	GKIDYQRTPA	++	(+)
44	HGTDTMEETA	-	-		94	IDYQRTPARK	-	++
45	TDTMEETAY	++	-		95	YQRTPARKHT	-	+
46	TMEETAYFL	++	-		96	RTPARKHTSD	-	++
47	EETAYFLDL	++	-		97	PARKHTSDTP	(+)	++
48	TAYFLDLTV	++	+		98	RKHTSDTPFD	++	+
49	YFLDLTVKCD	++	-		99	HTSDTPFDVS	++	+
50	LDLTVKCDKP	+	-		100	SDTPFDVSKL	++	+
					101	TPFDVSKLNE	++	++

102	FDVSKLNELP	(+)	++	?
103	VSKLNELPKV	-	++	++
104	KLNELPKVGI	(+)	++	++
105	NELPKVGIVY	++	-	
106	LPKVGIVYNY	++	-	
107	KVGIVYNYAN	+	-	
108	GIVYNYANAS	-	-	
109	VYNYANASDL	+	(+)	
110	NYANASDLPA	++	(+)	
111	ANASDLPAKA	++	++	++
112	ASDLPAKALV	++	++	++
113	DLPKALVDA	+	++	?
114	PAKALVDAGY	-	(+)	
115	KALVDAGYDG	-	(+)	
116	LVDAGYDGIV	++	(+)	
117	DAGYDGIVSA	++	(+)	
118	GYDGIVSAGV	++	(+)	
119	DGIVSAGVGN	-	+	?
120	IVSAGVGNGN	(+)	+	?
121	SAGVGNGNLY	-	(+)	
122	GVGNGNLYKS	-	-	++
123	GNGNLYKSUF	+	-	
124	GNLYKSUFDT	+	-	
125	LYKSUFDTLA	++	(+)	
126	KSVFDTLATA	++	+	
127	VFDTLATAAK	++	+	?
128	DTLATAAKNG	-	+	
129	LATAAKNGTA	(+)	+	++
130	TAAKNGTAVV	(+)	+	?
131	AKNGTAVVRS	(+)	+	?
132	NGTAVVRSSR	-	+	?
133	TAVVRSSRVP	-	++	?
134	VVRSSRVPTG	(+)	+	?
135	RSSRVPTGAT	(+)	+	
136	SRVPTGATTQ	+	+	
137	VPTGATTQDA	++	+	
138	TGATTQDAEV	+	+	
139	ATTQDAEVDD	(+)	+	
140	TQDAEVDDAK	+	+	
141	DAEVDDAKYG	-	-	
142	EVDDAKYGFV	++	-	
143	DDAKYGFVAS	++	-	
144	AKYGFVASGT	++	-	
145	YGFVASGTLN	-	(+)	
146	FVASGTLNPQ	-	+	?
147	ASGTLNPQKA	(+)	++	++
148	GTLNPQKARV	(+)	+	++
149	LNPQKARVLL	(+)	+	
150	PQKARVLLQL	-	+	
151	KARVLLQLAL	-	(+)	
152	RVLLQLALTQ	-	(+)	
153	LLQLALTQTK	-	(+)	++
154	QLALTQTKDP	-	(+)	
155	ALTQTKDPQQ	-	+	
156	TQTKDPQQIQ	-	+	

157	TKDPQQIQQI	+	++	++
158	DPQQIQQIFN	++	+	++
159	QQIQQIFNQY	++	-	

- = keine Antikörperbindung
 (+) = schwache Antikörperbindung
 + = mittelstarke Antikörperbindung
 ++ = starke Antikörperbindung
 ? = fraglich starke Antikörperbindung

Tabelle 3.1 Gegenüberstellung aller angefärbter SPOTs auf Membran I und II nach Screening mit Anti-EcA2-IgG (PKA), sowie den humanen Seren zweier Probanden (AW, HJM)

4. Diskussion

B-Zellepitope sind Gruppen von Aminosäuren auf der Oberfläche von Proteinen, die für deren Antigenizität verantwortlich sind. Erkannt werden diese Sequenzen von Antikörpern und B-Zellrezeptoren. Das Durchmustern von kombinatorischen Peptidbibliotheken, wie es in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, wird nicht als die optimale Methode angesehen, um Epitope zu identifizieren, sie gibt aber in der Regel bei vertretbarem Aufwand Hinweise auf „starke“ Epitope (Craig et al., 1998)^[19], während viele weniger dominante antigene Strukturen übersehen werden. Dies gilt vor allem für so genannte diskontinuierliche Epitope, die sich aus unterschiedlichen Bereichen der Peptidkette zusammensetzen, die nebeneinander auf der Proteinoberfläche angeordnet sind. Antikörper gegen das vollständig gefaltete Protein erkennen kurze lineare Peptide nur dann, wenn sie wichtige Abschnitte eines dominanten Epitops darstellen (Van Regenmortel, 1996)^[78]. Aus biochemischer Sicht wäre für das Screening eine Peptidlänge von acht Aminosäuren mit einer Überlappung von einem Rest die günstigste Variante gewesen. Da dies aber die Synthese von über 300 Peptiden erforderlich gemacht hätte, wurden in dieser Arbeit Decapeptide mit einem Overlap von zwei Resten gewählt.

4.1 SPOTs-Methodik

Im Gegensatz zum Phage Display, das aufgrund vielfältiger Einschränkungen, z.B. in der Bibliotheksgröße, nur beschränkt einsetzbar ist, ist die kombinatorische Peptidsynthese auf einer Zellulosemembran flexibler (Frank, 1992)^[25]. Deshalb stellt die SPOTs-Methodik eine alternative und gleichzeitig ergänzende Möglichkeit dar, wichtige Epitope zu identifizieren (Hohne et al, 1993; Ferrieres et al, 1998; Liu et al, 1999)^{[36], [23], [50]}.

4.1.1 Qualität und Reproduzierbarkeit der Membran

Auch bei der SPOTs-Technik treten eine Reihe von Problemen auf, die im Folgenden näher diskutiert werden. Wichtig ist z.B. die Frage bezüglich der Qualität der Syntheseprodukte und der Reproduzierbarkeit ihres Nachweises auf der Membran. Eine geringere Färbungsintensität spricht zwar für eine geringere Antikörper-Bindung, könnte aber zum Beispiel aber auch daran liegen, dass die Peptidmenge nicht auf jedem Spot genau dieselbe ist. Obwohl bei der Herstellung der Membranen große Sorgfalt angewendet und die Kupplungsreaktion jeder Aminosäure zweimal

durchgeführt wurde, konnten auch in dieser Arbeit signifikante Unterschiede in der Peptidmenge pro Spot nicht ausgeschlossen werden.

Kramer et al. (1999)^[48] untersuchten diese Problematik im Detail und kamen zu folgenden Schlussfolgerungen:

(1) Als Indikator für die Ligandenbindung an zellulosegebundene Peptide zeigte die gemessene Signalintensität eine gute Korrelation mit der Affinität der entsprechenden Peptide. Etwa 70% der 68 getesteten Epitope banden die entsprechenden Antikörper mit einer Standardabweichung des Chemilumineszenzsignals von <0.2 , wobei sich keine Korrelation zwischen der Standardabweichung und der Peptidlänge ergab. Dies lässt darauf schließen, dass bei Peptiden von 6-13 Aminosäuren die Qualität der synthetisierten Peptide mehr durch die Sequenz der Peptide als durch ihre Länge bestimmt wird.

(2) Durch eine Reduktion der Peptid-Dichte auf der Zellulosemembran lässt sich der so genannte „Ringeffekt“ vermeiden, d. h. der Zustand, wenn der Rand des Spots im Vergleich zum Zentrum stärker bindet. In dieser Arbeit trat der Ringeffekt jedoch kaum auf.

(3) Durch Massenspektroskopie wurde gezeigt, dass sehr unsaubere Signale meist auf unvollständige Entfernung des Seitenkettenschutzes zurückgehen, insbesondere bei den Aminosäuren Arginin und Serin. Um die Abspaltung zu optimieren, sollte die Membran vor Entfernung der Seitenketten zweimal für 30 min mit 90% TFA gespült werden. Daraus resultierte eine höhere Reinheit der synthetisierten Produkte.

4.1.2 Korrelation zwischen Signalintensität und Affinität

In einer späteren Publikation aus derselben Arbeitsgruppe kamen Weiser et al. (2005)^[97] zu ähnlichen Schlussfolgerungen. Auch diese Autoren zeigten, dass die bei der SPOTs-Technik gemessenen Signalintensitäten die Bindungsaffinitäten zumindest in halbquantitativer Weise korrekt wiedergeben, wenn bestimmte methodische Aspekte beachtet werden. Sie nutzten dazu eine Serie von Peptiden, deren Affinitäten zu den verwendeten Antikörpern bekannt waren, und kamen zur Empfehlung, die gemessenen Signale – ähnlich wie in vorliegender Arbeit – in drei Klassen einzuteilen (starke, mittlere und schwache Bindung). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine mittlere Signalintensität Dissoziationskonstanten von 10^{-5} M bis 10^{-7} M entspricht.

Zu den Faktoren, die die Korrelation zwischen Signal und Bindungsaffinität beeinflussen können, zählen neben der Synthese und Inhomogenitäten der Membran auch die Art des eingesetzten Detektionssystems. Beim Assay stehen prinzipiell drei Detektionsmöglichkeiten zur Verfügung, die von Reineke et al. (1995)^[79] vergleichend untersucht wurden: Das am häufigsten angewendete Verfahren basiert auf einer Detektion direkt auf der Membran, nachdem diese mit den entsprechenden Liganden inkubiert wurde. Das Signal entsteht hierbei durch spezifische Antikörper gegen das zu bindende Antigen und einen enzymkonjugierten Zweitantikörper, der spezifisch ist für die konstante Region des Antikörpers, in Verbindung mit einem geeigneten Substrat. Als Kontrolle muss hierzu die Membran gegen den Antikörper allein getestet werden (Kramer et al, 1999)^[48].

Weitere Methoden sind die indirekte Detektion von peptidgebundenen Liganden (Rüdiger et al, 1997)^[86] und der Proteinscan überlappender Peptide (Geysen et al, 1984)^[28]. Zur Identifizierung von linearen Epitopen ist die Peptid-Protein-Affinität ausreichend hoch, um standardmäßige Inkubations- und Detektionsprozeduren durchzuführen (Reineke et al, 1998)^[80]. Etwas schwieriger gestaltet sich dies bei diskontinuierlichen Bindungsstellen, was auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die Affinität dieser Epitope zu ihren entsprechenden Bindungspartnern geringer ist (Reineke et al., 1995, 1998)^{[79], [80]}. Die Werte der absoluten Signalintensität schienen vor allem von der Expositionszeit im Detektionsschritt abzuhängen (Kramer et al, 1999)^[48].

4.1.3 Auswertung

In dieser Arbeit haben wir uns für eine rein optische Auswertung entschieden und die gemessenen Intensitäten in die von Weiser et al. (2005)^[97] empfohlenen Klassen „keine Bindung“ (-), „schwache Bindung“ (+) oder „starke Bindung“ (++) eingeordnet. Der zunächst erwogene Ansatz, die Färbung der einzelnen Spots mit Hilfe eines Scanprogramms quantitativ zu erfassen, um damit subjektive Fehler zu vermeiden, wurde schnell wieder aufgegeben, da es Inhomogenitäten innerhalb der Spots und die Überfärbung vieler Spots unmöglich machten, eine sinnvolle Vermessung durchzuführen.

4.1.4 Eigenschaften der gefundenen Epitope

Trotz der oben diskutierten methodischen Schwierigkeiten legen unsere Daten nahe, dass es sich bei vielen der durch SPOTs-Analyse gefundenen Peptidsequenzen (siehe Tabelle 3.1) tatsächlich um B-Zellepitope handelt. Dafür sprechen folgende Beobachtungen:

(1) Viele der positiven Sequenzen wurden vom Antiserum nicht nur erkannt, wenn sie wie bei der SPOTs-Methode als lineare Peptide auf einer Zellulosemembran präsentiert werden, sondern ebenso durch Phage Display, wo sie als Teilsequenzen eines größeren Fusionsproteins auf der Oberfläche von Phagen vorliegen. In Abb. 4.1 sind die Ergebnisse von SPOTs und Phage Display vergleichend dargestellt. Die durch Phage Display besonders häufig identifizierten Sequenzen (z. B. VVNIGSQ, LYNAVVT, TPFDVSK und SVFDTLA) führten auch im SPOTs-Test zu sehr starken Signalen. Andererseits wurden einige der stark antigenen SPOTs-Peptide im Phage-Display selten oder gar nicht gefunden. Dies gilt zum Beispiel für die Peptide 45-48, 91-94, 142-144 und 157-159. In diesen Fällen könnte es sein, dass die betreffenden Sequenzen innerhalb der auf der Phagenoberfläche präsentierten Fusionsproteine nicht die für die Erkennung notwendige Konformation einnehmen können.

-----2----------19-----
 EcA.....**LP**NITIL**ATG** GTIAGGG**DSA** TKS**NY**TVG**KV** GVE**N**LV**NAV****P** **QLK**DI**AN**V**KG**
 LPSFRALSP **QLSKL** 50

 26 30 39 46
 EcA.....EQVV**NIGS**QD MNDNVWLT**LA** **KK**INTDC**DKT** DGFVITHGTD TMEETAYFLD
 AL**NL**GSR100
 AIN**L**GHR
 and 3 more

 60-62
 EcA.....LTVKCDK**PVV** MVG**AMP****PST**S MSADGPF**NLY** NAVVTAAD**KA** S**AN**RGVL**VVM**
 AVRP**VTP** **LY** AA**INL** (2x)150
 PEKQ AAR

 82 90
 EcA.....NDTVLDGRDV TKTNTTDVAT FKS**VNY****G**PLG **YI**H**NG**KID**YQ** RTPARKHT**SD**
 GPPP KSH200

 98-101 106 117 117
 EcA.....**TP**F**DV**S**KL**NE LPKV**GIV****YNY** ANASD**L**PA**KA** **LVD**AGYD**GIV** SAGVGNGN**LY**
 TLFDT**LK** **GT**LFD**Y** L **KL**PTQ**W** **L**250
 TLFDMLR
 TLFDVFR

 125-127 142-144
 EcA.....K**S**V**F**D**TLA**T**A** AKTGT**AV**VRS SRVPTGAT**TQ** **DAE**V**DD**A**KY**G FVASGTLNP**Q**
 SV**F**D**TLA** **AI**W**QK** **SW**300
 SL**F**D**TLA** (10x)
 SV**F**D**RLA** (3x)
 and 16 more

 158-159
 EcA.....KARV**L**Q**L**AL TQTKDPQ**QIQ** QIF**NQY**
 SFHT**FLQ**326

Abb. 4.1 Aufreihung der *E.coli* Asparaginase Aminosäuresequenz mit Antigenpeptiden identifiziert mithilfe der SPOTs-Technik (darüber) oder Phage-Display (darunter)

Von technischer Seite her kommen hier außer den oben erwähnten Problemen mit der Sicherstellung einer gleichmäßigen Peptidmenge per Spot auch Unterschiede in der Peptidpräsentation (Chirinos-Rojas et al, 1999)^[14], Limitationen der Peptidlängen im Phage Display aber auch die unterschiedlichen Sensitivitäten der beiden Methoden in Frage.

(2) Die meisten der durch beide Verfahren erkannten Epitopsequenzen scheinen – wie dies auch der Fall sein müsste – ganz oder teilweise an der Proteinoberfläche zu liegen. Um dies zu überprüfen, wurde mithilfe der DSSP-Software (Kabsch & Sander, 1983)^[39] für jeden Rest die Zugänglichkeit im EcA2-Tetramer ermittelt. Dabei wird ermittelt wie groß die Kontaktfläche dieser Reste zum umgebenden Lösungsmittel ist. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Abb. 4.2 dargestellt. In Abb. 4.1. sind außerdem Reste mit einer Kontaktfläche von 50-100 Å² einfach und solche mit Werten >100 Å² doppelt unterstrichen.

(3)

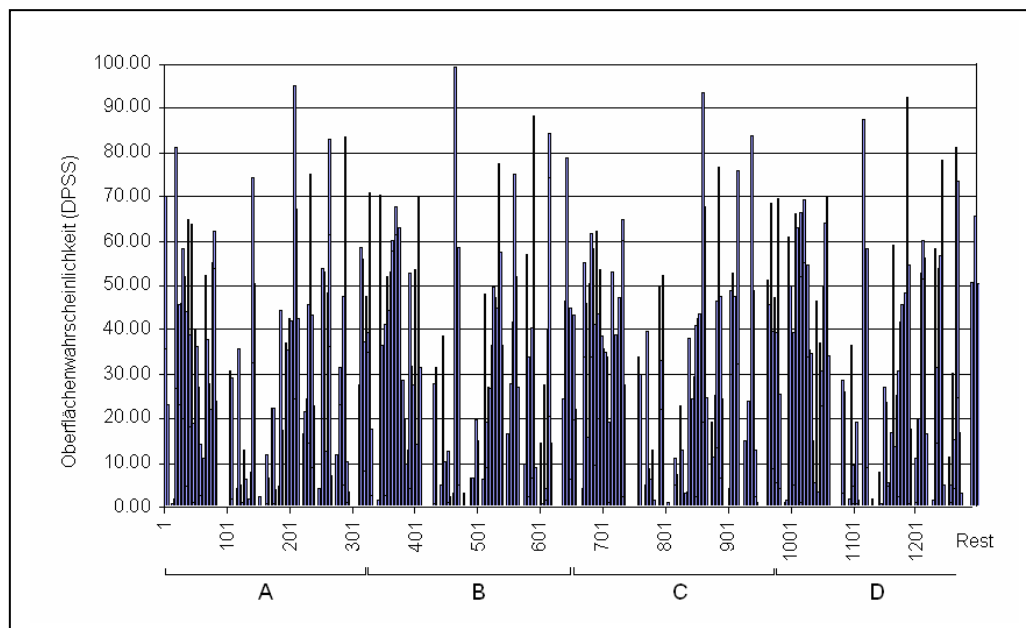


Abb. 4.2 Zugänglichkeit der Aminosäurereste der *E. coli*-Asparaginase. Die Werte wurden anhand der Kristallstruktur des tetrameren Proteins (PDB-Eintrag 3ECA) mit Hilfe des Programms DSSP (Kabsch & Sander, 1983) berechnet.

Bei diesen Überlegungen ist zu beachten, dass die Zugänglichkeiten auf der Grundlage der Struktur des nativen Tetramers berechnet wurden. Es ist jedoch bekannt, dass die Asparaginase in verdünnter Lösung teilweise als Dimere vorliegt, in der viele weitere Reste vom Lösungsmittel aus zugänglich sind (Verma, 2005)^[93]. So ist zum Beispiel Spot Nummer 82 im Tetramer unzugänglich, während er im Dimer an exponierter Stelle liegt. Des Weiteren handelt es sich bei der EcA2 um ein Enzym, das während der Substratbindung eine deutliche Konformationsänderung erfährt. Im Rahmen der Katalyse sind die vier aktiven Zentren des Enzyms von der umgebenden Lösung durch Proteinschleifen abgeschirmt, die jeweils von den Resten 14-26 gebildet werden. In Abwesenheit des Substrats sind diese Deckel

offen. Bindet das Substrat Asparagin oder der kompetitive Inhibitor Aspartat, wird die Schließung der Schleife induziert, was zur Aktivierung und einer deutlichen Stabilisierung des Proteins führt (Aung et al, 2000)^[6]. Angesichts dieser Tatsachen ist davon auszugehen, dass manche Epitope erst im freien Enzym oder erst bei Interaktion mit dem Substrat in Erscheinung treten können.

4.1.5 Vergleich mit *Erwinia*-Asparaginase

Im Jahre 1994 veröffentlichten Moola et al. die Ergebnisse eines Hexapeptid-Scans zur Identifizierung von Epitopen der Asparaginase aus *Erwinia chrysanthemi* (ErA, Moola et al, 1994)^[60]. Dieses Enzym („Erwinase“) wurde bis vor wenigen Jahren ebenfalls in der Therapie der ALL verwendet. Die Untersuchungen von Moola et al. ergaben, dass in ErA nur eine einzige Aminosäure-Sequenz von unterschiedlichen Antiseren erkannt wurde. Sie entspricht in *Erwinia*-Nummerierung den Resten 285-290 mit der Sequenz PPDEE.

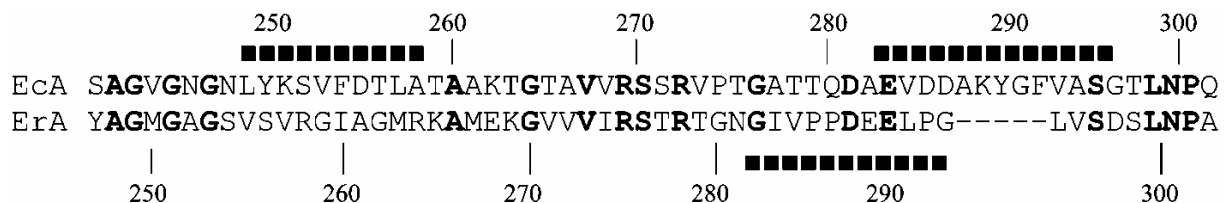


Abb. 4.3 Vergleichende Darstellung von Epitopen in der C-terminalen Domäne von *E. coli* (EcA) und *Erwinia chrysanthemi* (ErA) Asparaginase

Das in dieser Arbeit identifizierte, dominante EcA2-Epitop (SVFDTLA) reagierte dagegen nicht mit Antikörpern gegen native ErA. Dies wird verständlich, wenn man die entsprechenden Teilsequenzen von EcA2 und ErA vergleicht (Abb. 4.3). Die beiden Prolinreste im ErA-Epitop PPDEE (P-285 and P-286), die für die Antikörperbindung an ErA als entscheidend erkannt wurden, sind in EcA2 durch Threonin und Glutamin ersetzt. Umgekehrt ist auch das dominante EcA2-Epitop 249-259 im *Erwinia*-Enzym nicht konserviert (vgl. Abb. 4.3). Dies steht in Übereinstimmung mit dem Befund, dass EcA2 und ErA nur schwach kreuzreagieren (Hrushesky et al., 1976)^[37]. Genau aus diesem Grund wurde ErA häufig bei Patienten eingesetzt, die allergische Reaktionen gegen EcA2 entwickelt hatten.

4.1.6 Lage der dominanten EcA2-Epitope in der Tertiärstruktur

Wenn man die Lage der durch SPOTs-Analyse und Phage Display gefundenen dominanten EcA2-Epitope im nativen Tetramer untersucht, werden die räumlichen Beziehungen sichtbar, die eine mögliche Erklärung liefern, wie es bei der Reinduktionstherapie mit Asparaginase zum Phänomen der „stillen Inaktivierung“ kommen kann.

Obwohl die vier Monomere der *E. coli*-Asparaginase identisch sind, handelt es sich beim nativen Tetramer eigentlich um ein Dimer aus Dimeren, in denen die Untereinheiten A und C bzw. B und D jeweils ein „enges Paar“ bilden (Swain et al, 1993)^[91]. Die vier aktiven Zentren des Enzyms werden jeweils von der C-terminalen Domäne einer Untereinheit und der N-terminalen Domäne der jeweils anderen Untereinheit des betreffenden Paares gebildet. Dies ist in Abbildung 4.4A zu erkennen, in der das Paar A/C in bläulichen, das Paar B/D in rötlichen Farbtönen dargestellt ist.

In Abbildung 4.4B ist eines der vier aktiven Zentren der EcA2 (erkennbar an gebundenem Aspartat, Asp) vergrößert dargestellt. Es liegt zwischen den Untereinheiten B und D, wobei die bewegliche Peptidschleife 15-26 zur Untereinheit D gehört. Sie liegt hier in der geschlossenen Konformation vor und ist blau gefärbt. Drei der in dieser Arbeit identifizierten dominanten Epitope liegen in der unmittelbaren Umgebung des aktiven Zentrums:

- Reste 53-58 der Untereinheit D – entsprechend Spot 26 (hellrot markiert)
- Reste 253-257 der Untereinheit B – entsprechend Spot 126 (dunkelrot markiert)
- Reste 283-289 der Untereinheit B – entsprechend Spot 143 (pink markiert)

Die Seitenketten der jeweils am besten zugänglichen Reste dieser Sequenzen (N55, D255 und K288) sind als CPK-Modell gezeigt. Wie die Abbildung zeigt, bilden im nativen EcA2-Tetramer die Reste 53-58 und 283-289 Schleifen auf der Proteinoberfläche. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass zwei Reste aus dem ersten und dritten Epitop (S58 und E283) in direktem Kontakt mit dem gebundenen Substrat oder Inhibitor stehen. Die Aminosäuren 253-257 sind Bestandteil einer langen amphipatischen Helix, in der die Seitenketten der Reste K251, D255, T259 und K262 an der Oberfläche des Proteins liegen.

In Teil C von Abbildung 4.4 ist schließlich gezeigt, wo die entsprechenden Regionen auf der Oberfläche des B/D-Dimers liegen. Hier zeigt sich deutlich, dass sich alle drei Epitope so nah an der beweglichen Schleife (blau) befinden, dass die Bindung eines Antikörpers an eines der entsprechenden Epitope mit hoher Wahrscheinlichkeit die Bewegung der Schleife blockiert. Dies verhindert gleichzeitig auch die Katalyse durch EcA2, die darauf angewiesen ist, dass sich die Schleife öffnen und schließen kann. Auf diese Weise könnten Antikörper, die gegen eines der drei gezeigten Epitope gerichtet sind, zur „stillen Inaktivierung“ führen.

Zudem lässt aus Abb 4.4C vermuten, dass die beiden Epitopen auf Untereinheit B (253-257 bzw. 283-289) ein zusammenhängendes, diskontinuierliches Epitop bilden.

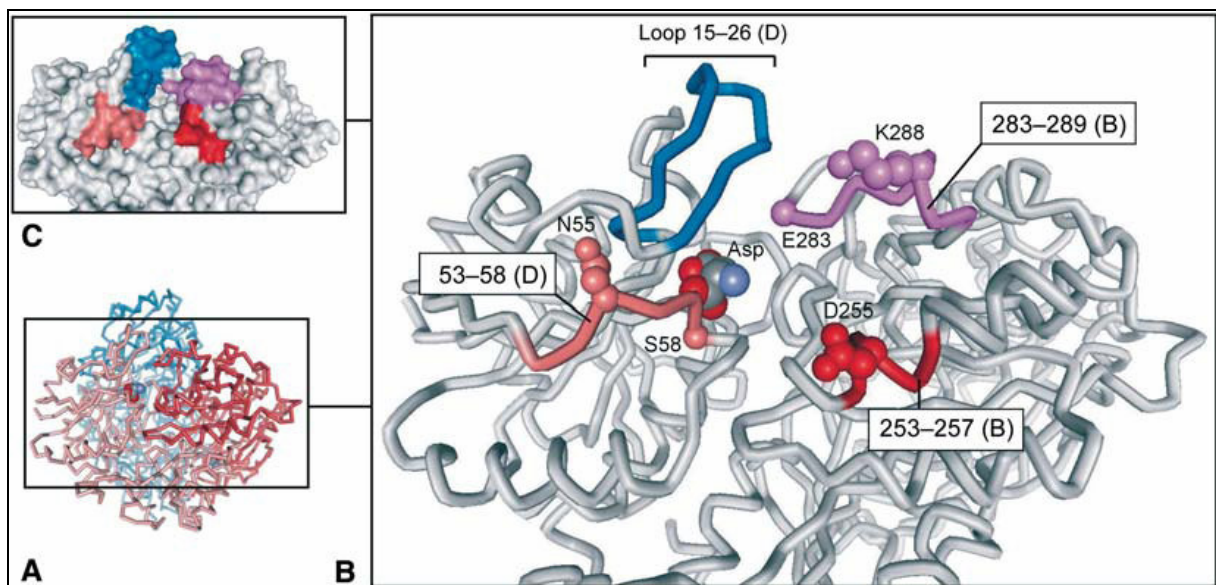


Abb. 4.4 Position der dominanten Epitope in der Nähe des aktiven Zentrums von *E. coli* Asparaginase (EcA)

Für eine präzise Eingrenzung der betreffenden Epitope müssten die hier gewählten Methoden durch Verfahren ergänzt werden, die die Bindungsaffinität quantitativ messen können, um auch den Einfluss von nicht-essentiellen Resten zu ermitteln (Choulier et al., 2001)^{[15], [16]}.

4.2 Reaktivität von Probandenserum

Ein unerwarteter Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass auch im Serum von zwei Probanden, die zuvor nicht mit *E. coli*-Asparaginase behandelt worden waren, deutliche Antikörpertiter gegen das Enzym nachweisbar waren. Einige SPOT-Peptide reagierten mit allen drei Antiseren in ähnlicher Weise, z. B. 32-33, 82-83, 98-

101,111-112 und 157-159 (siehe Tabelle 3.1). Dagegen wurde das dominante Epitop SVFDTLA (125-127) von beiden Probandenseren nur schwach oder gar nicht erkannt. Andere Peptide wiederum zeigten starke Reaktion mit den Seren der unbehandelten Probanden, nicht aber mit dem zunächst eingesetzten Kaninchenserum. Das gilt z.B. für die Spots 26-27, 45-49, 60-64, 102-104 und 142-144. Dies spricht dagegen, dass es sich bei den beobachteten Reaktionen der Probandenseren um Artefakte handelt, die durch unzureichendes Waschen der Membran nach dem ersten Screening mit Kaninchenserum zustande kam.

Dass auch bei zuvor nicht mit Asparaginase behandelten Probanden Antikörper gegen das Protein auftreten können, wurde schon von Körholz et al. (1990)^[44] beobachtet. Ähnliche Befunde sind in der Literatur für viele andere Antigene beschrieben worden. Im Falle der Asparaginase könnten die in nicht behandelten Versuchspersonen gefundenen Antikörper von früheren Kontakten mit Enzym stammen, das von *E. coli*-Zellen der Darmflora gebildet und von Antigen präsentierenden Zellen aufgenommen wurde. Unserer Beobachtung, dass nicht alle der mit Kaninchenserum nachweisbaren starken Epitope auch mit den Probandenseren reagierten, lässt sich durch die Annahme erklären, dass die jeweilige Antikörperbildung (im Kaninchen bzw. in den Probanden) durch Enzym aus unterschiedlichen *E. coli*-Stämmen ausgelöst wurde. Welches Enzym zur Gewinnung des Kaninchen-Antiserums eingesetzt wurde, ist nicht bekannt. Es bleibt jedoch offen, inwieweit die für die Experimente mit Probandenserum verwendeten Membranen schon zu oft mit Kaninchen-Serum inkubiert worden waren. Trotzdem gehen wir davon aus, dass eine frisch synthetisierte Membran problemlos auch mit menschlichem Serum hätte verwendet werden können.

4.3 Klinische Relevanz

Obwohl unsere Ergebnisse darauf hinweisen, dass ein Teil der identifizierten Epitope tatsächlich für die „silent inactivation“ verantwortlich ist, muss diese Schlussfolgerung zunächst durch weitere Experimente bestätigt werden. Dazu sollen zunächst wichtige Reste innerhalb dieser Epitope durch gerichtete Mutagenese gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden. Dadurch kann festgestellt werden, ob und wie sich solche Veränderungen auf die Antigenizität des Asparaginase-Proteins auswirken. Außerdem ist es so möglich, die für die Antikörperbildung entscheidenden Reste innerhalb des Epitops einzugrenzen. Zusätzlich müsste durch Einsatz längerer

Peptide versucht werden, auch diskontinuierliche Epitope ausfindig zu machen (Reineke et al., 1998)^[80].

Für die Unterstützung der Asparaginase-Therapie bieten die hier beschriebenen Daten mehrere Ansatzpunkte. Einmal könnte mit Patientenseren schon vor Beginn der Therapie, vor allem aber vor der Reinduktionsphase, getestet werden, wie hoch die Titer gegen die relevanten Epitope sind. Außerdem sollten vergleichende Untersuchungen mit Seren von ALL-Patienten durchgeführt werden, die

- Asparaginase problemlos vertragen
- Asn zwar klinisch gut vertragen, jedoch zur Gruppe der „silent inactivators“ gehören
- deutliche klinische Anaphylaxie-Symptomaten bieten.

Die dazu eingesetzten Serumproben sollten zu definierten Zeitpunkten während Induktion und Reinduktion gesammelt werden, um eine genaue Zuordnung innerhalb des Therapieprotokolls vornehmen zu können. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser drei Gruppen würde dazu beitragen, klinisch relevante Epitope zu identifizieren und Aussagen bezüglich Sensitivität und Spezifität des Antikörper-Assays treffen zu können.

Obwohl die Zusammenhänge statistisch noch nicht gesichert sind, deuten auch andere Arbeiten aus unserer Gruppe darauf hin, dass sich durch verbesserte Antikörper-Assays tatsächlich Patienten mit Neigung zu „stiller Inaktivierung“ oder auch zu allergischen Reaktionen gegen *E. coli*-Asparaginase ausfindig machen lassen (von Randow, 2005; Angermeyer, 2008)^{[77], [4]}. Für eine verbesserte Vordiagnostik dieser Art sollten außerdem die Titer von Antikörpern des Typs IgE in die Untersuchungen einbezogen werden. Auf diese Weise sollte es in der Zukunft möglich sein, im Rahmen eines verbesserten Asparaginase-Monitoring verlässliche und prognostisch relevante Aussagen über einzelne Patienten machen zu können.

4.5 Ausblick

Mit der Etablierung der SPOTs-Technik und den Erkenntnissen aus dem Phage Display ist ein vielversprechender Schritt zur Entwicklung eines epitopspezifischen Antikörper-Assays getan worden. Jedoch müssen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zunächst durch weitere, unabhängige Verfahren bestätigt und quantitativ

charakterisiert werden. Bei der zukünftigen Herstellung von Peptid-Arrays könnte weiterhin die SPOTs-Technik eingesetzt werden, wobei die in dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen vor allem in Hinblick auf die Reinigung von Lösungen und die Durchführung der Waschschriffe im Rahmen der Synthese bei der Realisierung dieser Experimente sehr nützlich sein sollten. Leider hat die Firma Sigma Genosys den Vertrieb des SPOTs-Kit eingestellt, bietet aber weiterhin an, SPOTs-Synthesen im Auftrag durchzuführen. Als Alternative stehen jedoch auch weitere Verfahren zur Herstellung von Peptid-Arrays zur Verfügung, z. B. der so genannte PepScan.

Weiterhin unbekannt ist auch, wie die Metabolisierung der Asparaginase im Körper abläuft. Von besonderem Interesse ist hierbei die Elimination. Nach wie vor stehen der enzymatische Abbau durch Proteasen oder Aufnahme in Zellen des RES zur Diskussion. Weitere Untersuchungen zu dieser Frage könnten ebenfalls entscheidend zur Therapieoptimierung beitragen.

5. Zusammenfassung

L-Asparaginase ist ein bakterielles Enzym, das erfolgreich in der Behandlung akuter lymphatischer Leukämien sowie einiger maligner Lymphome eingesetzt wird. Das Enzym bewirkt über eine hydrolytische L-Asparagin-Spaltung mit konsekutiver Verminderung der AS-Konzentration im Serum, dass Tumorzellen, welche essentiell auf das Vorhandensein der AS Asparagin angewiesen sind, keine weitere Möglichkeit zur Zellteilung mehr haben.

Neben diesem im Rahmen der Chemotherapie erwünschten Effektes kommt es jedoch auch zu ungewollten Nebenwirkungen und Überempfindlichkeiten. Besonders letztere, welche von schweren allergischen Schocks bis hin zu stummer Enzyminaktivierung ohne klinische Zeichen reichen können, stellen medizinisch ein großes Problem dar. Gelänge es, die potentiell für solche Reaktionen prädisponierten Patienten frühzeitig zu erkennen, könnte so eine deutliche Verbesserung des Therapieerfolgs erzielt werden.

Die bisher verwendeten immunologischen Nachweistests werden diesem Anspruch jedoch aufgrund zu geringer Sensitivität und Spezifität nicht gerecht.

Auf der Annahme basierend, dass es sich bei den gebildeten AK um epitopenspezifische handelt, begannen eine Reihe von Forschungsarbeiten zur genaueren Lokalisation selbiger innerhalb des Enzyms. Als Grundlage diente hierbei unter anderem die mithilfe eines Restriktionsverdau gewonnenen Erkenntnis, dass eine Antikörper-Population bei vorzeitiger Enzyminaktivierung vornehmlich gegen das C-terminale Fragment (237-326) gebildet wird, und die Tatsache, dass auch das Phage Display in etwa zwei Drittel der Fälle eine Identifikation der Sequenz 252-258 zeigte. Auch der SPOTs-Kit zeigte erneut diese dominante Sequenz (SVFDTLA) bei Verwendung von käuflich erworbenem Anti-Asparaginase-Serum, nicht jedoch bei zwei Proben von gesunden Probanden. Unter Berücksichtigung der räumlichen Lage jener Sequenz im Molekül scheint diese tatsächlich eine entscheidende Rolle bei der immunologischen Reaktion der stummen Inaktivierung zu spielen.

Die gewonnenen Ergebnisse bestärken die bisher eingeschlagene Forschungsrichtung und liefern weitere Anhaltspunkte in Richtung Entwicklung eines Epitopen-spezifischen Assays.

Um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können, müsste jedoch an entsprechenden Stichproben weiter untersucht werden.

6. Abkürzungsverzeichnis**A**

Ag	Antigen
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
ALL	Acute lymphatische Leukämie
ALT	Alanin-Amniotransferase
AML	Akute myeloische Leukämie
Anti-Asn-AK	Anti-Asparaginase-Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
Asn	Asparaginase
Asyn	Asparagin-Synthetase
AST	Aspartat-Aminotransferase

B

BB	Bromphenol-Blau
BCIG	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

C

CALGB	The Cancer and Leukaemia Group B
CCSG	Children's Cancer Study Group
CCG	Children's Cancer Group
CR	complete response/remission
CSF	Cerebrospinal fluid (Liquor)

D

DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleid acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure

E

EA	Essigsäureanhydrid
EcA	Escherichia coli Asparaginase
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ErA	Erwinia chrysanthemi Asparaginase
Et al.	Et alii/aliae/alia

F

FAB	French-American-British
-----	-------------------------

G

GST	Glutathion-S-Transferase
-----	--------------------------

H

HTLV-1	Human T-Lymphotropic Virus type 1
--------	-----------------------------------

J

JÜR	Jahres-Überlebens-Rate
-----	------------------------

K

KM	Knochenmark
KÖF	Körperoberfläche

L

LK	Lymphknoten
----	-------------

M

MG	Molekulargewicht
MHC	Major histocompatibility
MQW	Milli-Q-Wasser

N

NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NMP	1-Methyl, 2-Pyrrolidinon

P

p.a.	Pro analysis
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PR	Partielle Remission

R

RBA	Regenerationspuffer A (regeneration buffer A)
RBB	Regenerationspuffer B (regeneration buffer B)
RES	Reticulo-endotheliales System
RF	Risikofaktor
RNA	Ribonucleid acid
RNS	Ribonukleinsäure

S

SDS	Signalgebungslösung (signal development solution)
-----	---

T

T ^{1/2}	Halbwertszeit
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)
T-TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung/Tween
TFA	Trifluor-Essigsäure (trifluoroacetic acid)

U

u.a.	unter Anderem
------	---------------

V

v/v	volume to volume
-----	------------------

Z

ZNS	Zentrales Nervensystem
-----	------------------------

7. Literaturverzeichnis

1. Ahlke E, Nowak-Gottl U, Schulze-Westhoff P, Werber G, Borste H, Wurthwein G, Jurgens H and Boos J (1997). Dose reduction of asparaginase under pharmacokinetic and pharmacodynamic control during induction therapy in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 96, 675-681.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff K and Watson RJD (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage, 1421. Weinheim, Lothar Jaenicke, VCH.
3. Albertsen BK, Schroder H, Jakobsen P, Avramis VI, Muller HJ, Schmiegelow K and Carlsen NT (2002). Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with Erwinia asparaginase. *Med Pediatr Oncol*, 38, 310-316.
4. Angermeyer S (2008). Messung von L-Asparaginase-Antikörper-Titern von pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie der Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology unter Einsatz eines epitopenspezifischen ELISA. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg; noch in Arbeit.
5. Asselin BL, Whitin JC, Coppola DJ, Rupp IP, Sallan SE and Cohen HJ (1993). Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J Clin Oncol*, 11, 1780-1786.
6. Aung H.P, Bociola M, Röhm KH (2000). Dynamics of a mobile loop at the active site of E.coli asparaginase. *Biochim. Biophys Acta*, 1481, 349-59.
7. Bene MC. Proposals for the immunological classification of acute leukemia. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). (1995) *Leukemia*; 9 (10), 1783-6.
8. Broome JC (1961). Evidence that the L- asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*, 191, 1114-1115.
9. Bruggemann M (2006). Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 107(3);1116-23.
10. Buck PW, Elsworth R, Miller GA, Sargeant K, Stanley JL and Wade HE (1971). The batch production of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. *J Gen.Microbiol.*, 65, i.
11. Campbell HA and Mashburn LT (1969). L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Biochemistry*, 8, 3768-3775.
12. Capizzi RL, Bertino JR, Skeel RT, Creasey WA, Zanes R, Olayon C, Peterson RG and Handschumacher RE (1971). L-asparaginase: clinical, biochemical, pharmacological, and immunological studies. *Ann.Intern.Med*, 74, 893-901.

13. Cheung NK, Chau IY and Coccia PF (1986). Antibody response to *Escherichia coli* L-asparaginase. Prognostic significance and clinical utility of antibody measurement. *Am.J Pediatr Hematol.Oncol*, 8, 99-104.
14. Chirinos-Rojas C.L, Steward M.W, Partidos C.D, (1999). A phage display mimotope inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced cytotoxicity more effectively than the free mimotope. *Immunology*, 96, 109-113.
15. Choulrier L, Laune D, Orfanoudakis G, Wlad H, Janson JC, Granier C, Altschuh D. (2001). Delineation of a linear epitope by multiple peptide synthesis and phage display. *Journal Immunol.Methods*, 249, 253-264.
16. Choulrier L, Rauffer-Bruyère N, Ben Khalifa M, Martin F, Vernet T, Altschuh D (2001). Kinetic analysis of the effect on Fab binding of identical substitutions in a peptide and its parent protein. *Biochemistry*, 38, 3530-3537
17. Clarke M (2003). CNS-directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: Childhood ALL Collaborative Group overview of 43 randomized trials. *J Clin Oncology* 21(9);1798-1809.
18. Clarkson BD, Dowling MD, Gee TS, Cunningham IB and Burchenal JH (1975). Treatment of acute leukemia in adults. *Cancer* 36, 775-795.
19. Craig L, Sanschagrín PC, Rozek A, Lackie S, Kulm LA and Scott JK (1998). The role of structure in antibody cross-reactivity between peptides and folded proteins. *J Mol Biol*; Aug 7;281(1):183-201.
20. Dellinger CT and Miale TD (1976). Comparison of anaphylactic reactions to asparaginase derived from *Escherichia coli* and from *Erwinia* cultures. *Cancer*, 38, 1843-1846.
21. Deutsches Kinderkrebsregister. http://info.imsd.uni-mainz.de/K_Krebsregister/
22. Ertel ME, Inta J, Nesbit DH, Weiner J and Harland S (1979). Effective Dose of L-Asparaginase for Induction of Remission in Previously Treated Children with Acute Lymphocytic Leukemia: A Report from Childrens Cancer Study Group. *Cancer Research* 39(1), 3893-3896.
23. Ferriers G, Calzolari C, Mani JC, Laune D, Trinquier S, Laprade M, Larue C, Pau B, Granier C (1998). Human cardiac troponin I: precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure. *Clin. Chem.*, 44, 487-493
24. Frank R, Güler S, Krause S and Lindenmaier W (1991). Facile and rapid „spot-synthesis“ of large numbers of peptides on membrane sheets. In: *Peptides 1990. Proceedings of the 21st European Peptide Symposium*, eds E. Giralt and D Andreu. Pp. 151-152. Leiden: ESCOM.
25. Frank R (1992). Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*, 48, 9217

26. Frank R. H. Overwin H (1996). SPOT-synthesis: epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. In: G.E. Morris, Editor, *Methods in Molecular Biology Epitope Mapping Protocols* vol. 66, Humana Press, Totowa, p. 149.
27. Gallagher M, Marshall RD and Wilson R (1989). Asparaginase as a drug for treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Essays Biochem.*, 24:1-40., 1-40.
28. Geysen H.M., Meloen R.H., Barteling S.J. (1984) Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 3998.
29. Halimi H, Dumortier H, Briand JP and Muller S (1996). Comparison of two different methods using overlapping synthetic peptides for localizing linear B cell epitopes in the U1 snRNP-C autoantigen. *Journal of Immunological Methods* 199, 77-85.
30. Hall JG (1970). The Partitioning of L-asparaginase between Blood and Lymph. *Recent Results. Cancer Research* 33:75-80.
31. Haskell CM and Canellos GP (1969). L-asparaginase resistance in human leukemia asparaginase synthetase, *Biochem. Pharmacol.*, 18, 2578-2580.
32. Henze G (1993) Leukämien und spezielle Tumoren. In: *Krebs bei Kindern und Jugendlichen*, pp. 200-218. Ed. Peter Gutjahr, Deutscher Ärzteverlag, Köln,
33. Hersh E.M. (1973). Immunosuppressive enzymes. *Transplant. Proc.*, 5, 1211-1214.
34. Heveker N, Montes M, Germeroth L, Amara A, Trautmann A, Alizon M and Schneider-Mergener J (1998). Dissociation of the signalling and antiviral properties of SDF-1 derived small peptides. *Current Biology* 8. 369-376.
35. Hoffmüller U, Russwurm M, Kleinjung F (1999). Interaktion einer PDZ-Proteindomäne mit einer synthetischen Bibliothek aller C-Termini humaner Proteine. *Angew. Chem.* 111, 2180-2184.
36. Hohne, W.E., Kuttner, G., Kiebig, S., Hausdorf, G., Grunow, R., Winkler, K., Wessner, H. Giebmann, E., Stigler, R., Schneider-Mergener, J., Baehr, R.V., Schomburg, D. (1993). Structural base of the interaction of a monoclonal antibody against p24 of HIV-1 with its peptide epitope. *Mol. Immunol.*, 30, 1213-1221.
37. Hrushesky WJ, Slavik M, Penta J, Muggia F (1976). The 'other' asparaginase. *Med. Pediatr. Oncol.*, 2, 441-442.
38. Jones B, Holland JF, Glidewell O, Jacquillat C, Weil M and Hakami N (1977). Optimal use of L-asparaginase (NSC-109229) in acute lymphocytic leukemia. *Med Pediatr Oncol*, 3, 387-400.
39. Kabsch W., Sander C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*. 22, 2577-6637.

40. Kidd JG (1953). Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *J Exp Med*, 98, 565-582.
41. Killander D, Dohlwitz A, Engstedt L, Franzen S, and Ahstrom L (1976). Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer*, 37, 220-228.
42. Kodama J, Kazuo H, Shiro K, Kwanji I, Kazuo K and Hiroshi W (1974). Entstehungsmechanismus von L-Asparaginase-Nebenwirkungen und deren Bekämpfung. *Annals of Hematology*, 28, 43-50.
43. Korholz D, Urbanek R, Nurnberger W, Jobke A, Gobel U and Wahn V (1987) Formation of specific IgG antibodies in l-asparaginase treatment. Distribution of IgG subclasses. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 135, 325-328.
44. Korholz, D., Wahn, U., Jürgens H., Wahn, V. (1990) Allergische Reaktionen bei Behandlung mit L-Asparaginase. Bedeutung spezifischer IgE-Antikörper. *Monatsschr. Kinderheilk.* 138, 23-25.
45. Kramer A, Volkmer-Engert R, Malin R, Reineke U, Schneider-Mergener J. (1993). Simultaneous synthesis of peptide libraries on single resin and continuous cellulose membrane supports: examples for the identification of protein, metal and DNA binding peptide mixtures, *J. Pept. Res.*, 6, 314.
46. Kramer A, Schuster A, Reineke U, Malin R, Volkmer-Engert R, Landgraf C and Schneider-Mergener J (1994). Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tools for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity. *Methods Companion Methods Enzymol*, 6, 388-395.
47. Kramer A, Stigler T, Knaute B, Hoffmann H and Schneider-Mergener J, (1998). Stepwise transformation of a cholera toxin and a p24 (HIV-1) epitope into D-peptide analogs. *Protein Eng.* 11, 941.
48. Kramer, A., Reineke, U., Dong, L., Hoffmann, B., Hoffmuller, U., Winkler, D., Volkmer-Engert, Schneider-Mergener, J. (1999). Spot synthesis, observations and optimisations. *J. Pept. Res.*, 54, 319.
49. Kurtzberg J, Asselin B and Pollack B (1993). PEG-L-asparaginase (PEGasp) vs native E.coli asparaginase (asp) for reinduction of relapsed acute lymphoblastic leukemia (ALL): POG#8866 phase II trial [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol.* 12 :325.
50. Liu, Z., Song, D., Kramer, A., Martin, A.C., Dandekar, T., Schneider-Mergener, J., Bautz, E.K., Dubel, S. (1999). Fine mapping of the antigen-antibody interaction of scFv215, a recombinant antibody inhibiting RNA polymerase II from *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Recognit.*, 12, 103-111.
51. Loo DM, te (2006). Prognostic significance of blasts in the cerebrospinal fluid without pleocytosis or a traumatic lumbar puncture in children with acute

- lymphoblastic leukaemia: experience of the Dutch Childhood Oncology Group, *J Clin Oncol*; 24(15); 2332-36.
52. Malin R, Steinbrecher R, Jannsen J, Semmler W, Noll B, Johannsen B, Frömmel C, höhne W and Schneider-Mergener J (1995). Identification of Technetium-99m binding peptides using combinatorial cellulose-bound peptide libraries. *Journal of the American Chemical Society* 117. 11821-11822.
53. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG (2003): Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Pizzo PA, Poplack DG (Hrsg.): Principles and Practice of Pediatric Oncology. 4th Edition. Lippincott Williams&Wilkins. Baltimore, 2003. ISBN 0-7817-2658-1
54. Marshall GM (2003). Importance of minimal residual disease testing during the second year of therapy with acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Oncol*, 21(4);704-9.
55. Mashburn LT and Wriston JC, Jr. (1964). Tumor inhibitor effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch.Biochem.Biophys.*, 105:450-2., 450-452.
56. Mathe G, Amiel JL, Clarysse A, Hayat M and Schwarzenberg L (1970) The place of the L-asparaginase in the treatment of acute leukemias. *Recent Results Cancer Res.*, 33:278-87., 278-287.
57. Merrifield RB (1963), Solid phase peptide synthesis: I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85, p. 2149.
58. Moilanen AM, Karvonen U, Poukka H, Jänne OA and Palvimo, JJ (1998). Activation of androgen receptor function by a novel nuclear protein kinase. *Molecular Biology of the cell* 9. 2527-2543.
59. Molina F., Laune, D., Gougat, C., Pau, B., Granier, C. (1996). Improved performance of spot multiple peptide synthesis. *Pept. Res.*, 9, 151.
60. Moola ZB, Scawn MD, Atkinson T, Nicholls DJ (1994). *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase: epitopes mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochem. J.*, 302, 921-927.
61. Moricke A (2005). Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia: data from the trials ALL-BFM 86,90 and 95. *Klin. Padiatr*; 217:310-30.
62. Muller HJ, Boos J, Horn AC, Cohen LL, Avramis VI (1998). Determination of immunological cross-reactivity between different native and pegylated asparaginase preparations. *Med Pediatr Oncol*, 31(4), 350, Abstract SIOP Meeting October 4-8, Yokohama, Japan
63. Muller HJ and Boos J (1998). Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev.Oncol Hematol.*, 28, 97-113.
64. Muller HJ, Loning L, Horn A, Schwabe D, Gunkel M and Boos J (2000) Pegylated asparaginase (Oncaspar) in children with ALL: drug monitoring in

- p>reinduction according to the ALL/NHL-BFM 95 protocols. Br J Haematol, 379-384.
65. Münchner Tumorregister. <http://www.tumorregister-muenchen.de/>
 66. Nachman JB, Harland NS, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM and Gaynon PS (1998). Augmented Post-Induction Therapy for Children with High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia and a Slow Response to Initial Therapy. N Engl J Med; 339:1080-1081, Oct 8.
 67. Nesbit M, Chard R and Evans A (1979). Evaluation of intramuscular versus intravenous administration of L-asparaginase in childhood leukemia. Am J Pediatr Hematol Oncol 1, 9-13.
 68. Nowak-Gottl U, Kuhn N, Wolff JE, Boos J, Kehrel B, Rath B and Jurgens H (1996) Inhibition of hypercoagulation by antithrombin substitution in E. coli L-asparaginase-treated children. Eur.J Haematol, 56, 35-38.
 69. Nowak-Gottl U, Ahlke E, Klosel K, Jurgens H and Boos J (1997). Changes in coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukaemia re-induction therapy using three different asparaginase preparations. Eur.J Pediatr, 156, 848-850.
 70. Nyvold C (2002). Precise quantification of minimal residual disease at day 29 allows identification of children with acute lymphoblastic leukaemia and an excellent outcome. Blood 99(4); 1253-58.
 71. Oettgen HF, Schulten HK (1969) Hemmung maligner Neoplasien des Menschen durch L-Asparaginase. Klinische Wochenschrift 47: 65-68
 72. Ohnuma T, Holland JF, Nagel G and Arneault GS (1969) Effects of L-asparaginase in acute myelocytic leukemia. JAMA, 210, 1919-1921.
 73. Ohnuma T, Holland JF, Freeman A and Sinks LF (1970). Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. Cancer Res., 30, 2297-2305.
 74. Ortega JA, Nesbit ME, Jr., Donaldson MH, Hittle RE, Weiner J, Karon M and Hammond D (1977). L-Asparaginase, vincristine, and prednisone for induction of first remission in acute lymphocytic leukemia. Cancer Res., 37, 535-540.
 75. Pratt CB, Simone JV, Zee P, Aur RJ and Johnson WW (1970). Comparison of daily versus weekly L-asparaginase for the treatment of childhood acute leukemia. J Pediatr, 77, 474-483.
 76. Raff T (2007). Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. Blood; 109(3);920-5.
 77. Randow J, von (2005). Entwicklung eines Antikörper- Assays zur Risikoabschätzung anaphylaktischer Reaktionen sowie der Inaktivierungswahrscheinlichkeit des Enzyms L- Asparaginase in der Therapie der akuten lymphatischen Leukämie, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des

Doktorgrades der Humanmedizin im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg.

78. Regenmortel MHV van, (1996). Mapping epitope structure and activity: from one-dimensional prediction to four-dimensional description of antigenic specificity. *Methods*, 9, 465-472.
79. Reineke U, Sabat R, Kramer A, Stigler RD, Seifert M, Michel T, Volk D, Schneider-Mergener J (1995). Mapping of protein-protein contact sites using cellulose-bound peptide scans, *Mol. Diversity.*, 54, 141-148.
80. Reineke U, Sabat R, Volk HD, Schneider-Mergener J. (1998) Mapping of the interleukin-10/interleukin-10 receptor combining site. *Protein Sci.*, 7, 951-960.
81. Reineke U, Volkmer-Engert R, Welschof M, Terness P and Schneider-Mergener J (1999). A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. *Nature Biotechnology* 17, 271-275.
82. Reuter M, Schneider-Mergener J, Kupper D, Meisel A, Mackeldanz P, Krüger DH and Schroeder C (1999). Regions of endonuclease EcoRII involved DNA target recognition identified by membrane-bound peptide repertoires. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 5213-5221.
83. Ribera JM (2002). Prognostic value of karyotypic analysis in children and adults with high-risk acute lymphoblastic leukemia included in the PETHEMA ALL-93 trial. *Haematologica*; 87(2):154–166.
84. Riccardi R, Holcenberg JS, Glaubiger DL, Wood JH and Poplack DG (1981). L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. *Cancer Res.*, 4554-4558.
85. Riemkasten G, Marell J, Trebeljahr G, Klein R, Hausdorf G, Häupl T, Schneider-Mergener J, Burmester GR and Hepe F (1998). A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation*, 102. 754-763.
86. Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening of cellulose-bound peptide libraries. *EMBO*, 54, 1501-1507.
87. Schneider-Mergener J, Kramer A and Reineke U (1996). Peptide libraries bound to continuous cellulose membranes: Tools to study molecular recognition. In *Combinatorial Libraries: Synthesis, Screening and Application Potential*, ed. R Cortese, New York. Walter de Gruyter.
88. Schleper S (1999). Kinetische Untersuchungen und Modellstudien zur Funktion essentieller Reste im aktiven Zentrum der L-Asparaginase II aus E.coli. Dissertation im Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg.
89. Schreiber M, Wachsmuth C, Müller H, Odemuyiwa S, Schmitz H, Meyer S, Meyer B and Schneider-Mergener J (1997). The V3-directed immune

response innatural human immunodeficiency virus type 1 is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain. *Jornal of Virology*, 71, 9198-9205.

90. Schwartz MK, Lash ED, Oettgen HF and Tomato FA (1970). L-asparaginase activity in plasma and other biological fluids. *Cancer*, 25, 244-252.
91. Swain, A.L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao, J.K.M., Wlodawer, A. (1993). Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1474-1478.
92. Tegge W, Dostmann W, Hofmann F and Frank R (1995). Determination of the specifities of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases with peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry* 34. 10569-10577.
93. Verma S. (2005) Systematic site-directed mutagenesis to characterize subunit interactions in *E. coli* asparaginase II, an enzyme used in leukemia treatment. Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Philipps-University Marburg.
94. Volkmer-Engert R, Hoffmann B and Schneider-Mergener J (1997). Stable attachment of the HMB-linker to continuous cellulose membranes for parallel solod phase spot synthesis. *Tetrahedon Lett*, 38, 1029-1032.
95. Wang B, Hak LJ, Relling MV, Pui CH, Woo MH and Storm MC (2000). ELISA to evaluate plasma anti-asparaginase IgG concentrations in patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol.Methods*, 239, 75-83.
96. Weiergräber O, Schneider-Mergener J, Grötzinger J, Wollmer A, Küster A, Exner M and Heinrich PC (1996). Use of immobilized synthetic peptides for the identification of contact sites between human interleukin-6 and its receptor. *FEBS Letters* 379, 122-126.
97. Weiser AA, Or-Guil M, Tapia V, Leichsenring A, Schuchhardt J, Frömmel C, Volkmer-Engert R (2005). SPOTs-synthesis: Realiability of array-based measurement of peptide binding affinity. *Anal. Biochem.* 342, 300-311.
98. Werner A, Röhm KH and Müller HJ (2005). Mapping of B-cell epitopes in *E.coli* asparaginase II, an enzyme used in leukemia treatment. *Biol.Chem.*, 386, 535-540.
99. Woo MH, Hak LJ, Storm MC, Evans WE, Sandlund JT, Rivera GK, Wang B, Pui CH and Relling MV (1998). Anti-asparaginase antibodies following *E. coli* asparaginase therapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 12, 1527-1533.
100. Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R, Ramakers-Van Woerden NL, den Boer ML, Wunsche R, Rottier MM, Hahlen K, van Wering ER, Janka-Schaub GE, Creutzig U and Veerman AJ (2000). Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 96, 2879-2886.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Katalytische Aktivität der Asparagin-Synthetase (ASYN)	S. 13
Abb. 1.2 Struktur der E.coli-Asparaginase	S. 15
Abb. 1.3 Konzentrationen von Anti-Asnase-Antikörpern	S. 22
Abb. 1.4 Fusionsproteine mit GST zur Bestimmung von Antikörpertitern	S. 23
Abb. 3.1 Membran I nach Screening mit Anti-EcA2-IgG (Kaninchen)	S. 46
Abb. 3.2 Membran II nach Screening mit Anti-EcA2-IgG (Kaninchen)	S. 46
Abb. 3.3 Membran I nach Screening mit Serum Proband A.W.	S. 47
Abb. 3.4 Membran II nach Screening mit Serum Proband A.W.	S. 48
Abb. 3.5 Membran I nach Screening mit Serum Proband H.-J.M.	S. 49
Abb. 3.6 Membran II nach Screening mit Serum Proband H.-J.M.	S. 49
Abb. 4.1 Gegenüberstellung Asn-AS-Sequenz mit Antigenpeptiden	S. 56
Abb. 4.2 Zugänglichkeit der Aminosäurereste der E. coli-Asparaginase	S. 57
Abb. 4.3 Vergleichende Darstellung von Epitopen in der C-terminalen Domäne	S. 58
Abb. 4.4 Position der dominanten Epitope in der Nähe des aktiven Zentrums	S. 60

9. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Zytomorphologische Befunde bei ALL nach FAB-Klassifikation	S. 10
Tab. 1.2 Chemotherapeutika in den Behandlungsphasen der ALL	S. 12
Tab. 2.1 Menge der zu verwendenden Aminosäuren	S. 36
Tab. 2.2 Synthesepläne („Schedule“) Durchgang 1 und 2, Membran I	S. 38
Tab. 3.1 Gegenüberstellung Membran I und II nach Screening	S. 51

10. Anhang

10.1 Übersicht SPOTs-Sequenzen

1	994.4	LPNITILATG	49	1,198.6	YFLDLTVKCD
2	942.3	NITILATGGT	50	1,113.5	LDLTVKCDKP
3	899.3	TILATGGTIA	51	1,083.4	LTVKCDKPVV
4	799.2	LATGGTIAGG	52	1,099.4	VKCDKPVVMV
5	787.1	TGGTIAGGGD	53	1,000.3	CDKPVVMVGA
6	787.1	GTIAGGGDSA	54	1,069.4	KPVVMVGAMR
7	858.2	IAGGGDSATK	55	1,028.3	VVMVGAMRPS
8	875.1	GGGDSATKSN	56	1,018.3	MVGAMRPSTS
9	1,025.2	GDSATKSNYT	57	1,006.3	GAMRPSTSMS
10	981.2	SATKSNYTAG	58	1,064.3	MRPSTSMSAD
11	1,050.3	TKSNYTAGKV	59	931.1	PSTSMSADGP
12	977.2	SNYTAGKVG	60	1,008.2	TSMSADGPFN
13	1,019.2	YTAGKVGVEN	61	1,096.4	MSADGPFNLY
14	967.2	AGKVGVENLV	62	1,063.3	ADGPFNLYNA
15	1,024.2	KVGVENLVNA	63	1,075.3	GPFNLYNAV
16	993.1	GVENLVNAVP	64	1,093.3	FNLYNAVVT
17	1,078.1	ENLVNAVPQL	65	1,018.2	LYNAVVTAA
18	1,078.2	LVNAVPQLKD	66	941.1	NAVVTAAK
19	1,050.2	NAVPQLKDIA	67	914.1	VVTAADKAS
20	1,078.2	VPQLKDIANV	68	986.2	TAADKASAN
21	1,067.3	QLKDIANVKG	69	970.2	ADKASANRG
22	1,083.2	KDIANVKGEQ	70	996.3	KASANRGVL
23	1,038.1	IANVKGEQVV	71	1,027.3	SANRGVLVVM
24	1,081.1	NVKGEQVVNI	72	1,098.3	NRGVLVVMND
25	1,012.1	KGEQVVNIGS	73	1,028.2	GVLVVMNDTV
26	1,069.9	EQVVNIGSQD	74	1,100.3	LVVMNDTVLD
27	1,058.1	VVNIGSQDMN	75	1,101.3	VMNDTVLDGR
28	1,090.1	NIGSQDMNDD	76	1,085.2	NDTVLDGRDV
29	1,148.1	GSQDMNDDVW	77	1,085.3	TVLDGRDVT
30	1,218.2	QDMNDDVWLT	78	1,100.3	LDGRDVTKT
31	1,159.4	MNDDVWLT	79	1,074.2	GRDVTKTNT
32	1,170.5	DDVWLT	80	1,075.1	DVTKTNTT
33	1,167.6	VWLT	81	1,033.1	TKTNTT
34	1,098.5	LT	82	1,079.2	TNTT
35	1,102.5	LAKKINTDCD	83	1,050.2	TTDVAT
36	1,147.5	KKINTDCDKT	84	1,125.3	DVAT
37	1,063.3	INTDCDKTDG	85	1,065.3	ATF
38	1,082.3	TDCDKTDGFV	86	1,063.4	FKSVNYG
39	1,080.4	CDKTDGFVIT	87	1,064.4	SVNYG
40	1,056.4	KTDGFVITHG	88	1,129.5	NYG
41	1,043.3	DGFVITHGTD	89	1,037.5	GPLGYI
42	1,103.4	FVITHGTD	90	1,111.6	LG
43	1,115.3	ITHGTD	91	1,232.5	YI
44	1,073.2	HGTD	92	1,213.4	HNGKID
45	1,189.3	TD	93	1,130.3	GKID
46	1,201.4	TMEETAYF	94	1,229.4	IDYQ
47	1,183.4	EETAYFLDLT	95	1,239.4	YQRT
48	1,152.5	TAYFLDLTVK	96	1,150.4	RTPARK
			97	1,091.3	PARK
			98	1,185.4	RKHT
			99	1,087.2	HTSD
			100	1,090.3	SDTP

101	1,131.3	TPFDVSKLNE	153	1,110.3	LLQLALTQTK
102	1,143.4	FDVSKLNELP	154	1,096.1	QLALTQTKDP
103	1,108.4	VSKLNELPKV	155	1,110.9	ALTQTKDPQQ
104	1,092.5	KLNELPKVGI	156	1,167.8	TQTKDPQQIQ
105	1,113.4	NELPKVGIVY	157	1,179.9	TKDPQQIQQI
106	1,147.5	LPKVGIVYNY	158	1,211.9	DPQQIQQIFN
107	1,122.4	KVGIVYNYAN	159	1,290.9	QQIQQIFNQY
108	1,053.3	GIVYNYANAS			
109	1,111.3	VYNYANASDL			
110	1,017.2	NYANASDLPA			
111	939.2	ANASDLPAKA			
112	966.3	ASDLPAKALV			
113	994.3	DLPKALVDA			
114	986.3	PAKALVDAGY			
115	990.3	KALVDAGYDG			
116	1,003.3	LVDAGYDGIV			
117	949.2	DAGYDGIVSA			
118	919.2	GYDGIVSAGV			
119	870.1	DGIVSAGVGN			
120	869.1	IVSAGVGNGN			
121	933.2	SAGVGNGNLY			
122	1,004.3	GVGNGNLYKT			
123	1,094.4	GNGNLYKTVF			
124	1,139.4	GNLYKTVFDT			
125	1,152.5	LYKTVFDTLA			
126	1,048.3	KTVFDTLATA			
127	1,018.3	VFDTLATAAK			
128	943.2	DTLATAAKNG			
129	899.2	LATAAKNGTA			
130	913.1	TAAKNGTAVV			
131	984.2	AKNGTAVVRS			
132	1,028.2	NGTAVVRSSR			
133	1,053.2	TAVVRSSRVP			
134	1,039.2	VVRSSRVPTG			
135	1,013.2	RSSRVPTGAT			
136	999.0	SRVPTGATTQ			
137	941.9	VPTGATTQDA			
138	973.9	TGATTQDAEV			
139	1,045.9	ATTQDAEVDD			
140	1,073.0	TQDAEVDDAK			
141	1,064.2	DAEVDDAKYG			
142	1,124.3	EVDDAKYGfV			
143	1,054.3	DDAKYGfVAS			
144	982.3	AKYGfVASGT			
145	1,010.3	YGfVASGTLN			
146	1,015.1	FVASGTLNPQ			
147	968.1	ASGTLNPQKA			
148	1,065.2	GTLNPQKARV			
149	1,133.4	LNPQKARVLL			
150	1,147.3	PQKARVLLQL			
151	1,106.5	KARVLLQLAL			
152	1,136.3	RVLLQLALTQ			

10.2 Buchstabencodes der Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamat	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

11. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Albert, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Büch, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Ray, Dodel, Dünne, Dominguez, Duda, Eberhart, Engenhardt-Cabillic, Feiber, Fuchs, Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Grzeschik, Grimm, Groß, Gudermann, Hadji, Hamer, Happle, Hartmann, Hasilik, Hermann-Lingen, Hertl, Hofbauer, Hofmann, Hörle, Kalder, Kann, Kanngiesser, Kill, Klaus, Klose, König, Koolmann, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kühnert, Langer, Lemke, Lill, Löffler, Maisch, Mann, Martin, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Neubauer, Oertel, Reinartz, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rose, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schüffel, Schultz, Seitz, Sommer, Stiletto, Tebbe, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Wahl, Weihe, Werner.